

**Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

und der

Abteilung Invasive Kardiologie, Klinikum Starnberg

Prof. Dr. med. U. Pohl (Walter-Brendel-Zentrum)

Prof. Dr. med. F. Krötz (Leitender Arzt Invasive Kardiologie)

**Die Bedeutung des TNF α -Rezeptors 1 auf die
Endothelfunktion nach
Ischämie/Reperfusion**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Daniel Illyas Chaudhry

aus München (Deutschland)

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig- Maximilians- Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Krötz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Antje Habicht

Dekan: Herr Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2016

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. TNF α	5
1.1.1. TNF α -Rezeptoren	5
1.1.2. Zelluläre Wirkungen von TNF α	5
1.2. Das Endothel	8
1.2.1. Rolle des Endothels für die Regulation des Gefäßtonus	9
1.2.2. Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose	12
1.2.3. Rolle von TNF α bei endothelialer Dysfunktion.....	12
1.3. Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. Hypoxie/Reoxygenierung (H/R)	14
1.4. Fragestellung	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Versuchstiere und Versuchshaltung.....	17
2.2. Narkose.....	17
2.3. Versuchsvorbereitung und Katheterisierung	18
2.4. Präparation des Musculus Cremaster	19
2.5. Superfusionsaufbau.....	22
2.6. In-Vivo-Mikroskopie	23
2.7. Anlegen der Ischämie und Reperfusion	24
2.8. Versuchsablauf	25
2.9. Zellkultur.....	26
2.9.1. Kultivierung von Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC)	26
2.9.2. Zell-Lyse	26
2.9.3. Proteinbestimmung.....	27
2.9.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.9.5. Wet- Blotting	28
2.9.6. Nachweis von TNF α -Rezeptor 1 mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz	29
2.9.7. Posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels Magnetofektion	30
2.9.8. Hypoxie/Reoxygenierung mittels Hypoxiekammer.....	31
2.9.9. Superoxidradikalmessung mittels Cytochrom- C- Reduktions Assay	32
2.10. Statistik	34

3. Ergebnisse	35
3.1. Präsenz der TNF α -Rezeptors 1 in HMEC's und Wirkung der Magnetotransfektion	35
3.1. Sauerstoffradikale in HMEC's	36
3.1.1. Sauerstoffradikale nach Hypoxie/Reperfusion	36
3.2. Präsenz der TNF α -Rezeptoren in Wildtyp und TNF α – Rezeptor - Knockout Mäusen in vivo	38
3.3. Acetylcholin vermittelte Vasodilatation im intakten Endothel und nach I/R	39
3.4. Vasodilatationskapazität in TNFR1-KO Mäusen	41
3.5. Vasodilatation in TNFR2-KO Mäusen	42
3.6. Vasodilatation in TNFR1/2-KO Mäusen nach Ischämie/Reperfusion	43
3.7. Vergleich der Vasodilatation von TNFR1-KO mit TNFR1/2-KO Mäusen nach Ischämie/Reperfusion	44
4. Diskussion	45
4.1. Methodendiskussion	45
4.1.1. Cremaster-Modell der Maus	45
4.1.2. Ischämie/Reperfusion und Hypoxie/Reperfusion	46
4.1.3. Messung der endothelabhängigen Vasodilatationskapazität	47
4.2. Sind auf Endothelzellen TNF α -Rezeptoren vorhanden?	48
4.3. Bildet das Endothel nach Hypoxie/Reoxygenierung in vitro Sauerstoffradikale und hat der TNF α -Rezeptor 1 Einfluss auf die Radikalproduktion?	50
4.3.1. Bedeutung von Sauerstoffradikalen	50
4.3.2. Einfluss von TNFR1 auf die Bildung von Sauerstoffradikalen	51
4.4. Welchen Einfluss hat Ischämie/Reperfusion auf die Endothelfunktion in vivo und welche Rolle hat TNF α auf diese?	51
4.5. Rolle der TNF α -Rezeptoren	53
4.6. Pathophysiologische und Klinische Konsequenzen	55
5. Zusammenfassung	56
6. Appendix	58
6.1. Abkürzungsverzeichnis	58
6.2. Abbildungsverzeichnis	60
6.3. Danksagung	61
6.4. Literaturverzeichnis	62
6.5. Eidesstattliche Versicherung	68

1. Einleitung

1.1. TNF α

Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) ist ein Signalstoff im Körper, welcher an vielerlei Prozessen im Stoffwechsel der Zelle beteiligt ist. Es wird hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von fast allen Immunzellen, Mastzellen, Nervengewebe, Kardiomyozyten und Endothelzellen gebildet. [1] Es gibt die lösliche Form von TNF α in Form von Homotrimeren bestehend aus 157 Aminosäuren und eine membrangebundene. Entdeckt wurde es im Jahre 1975 von Dr. Lloyd J. Old. Der Name rührt von seiner Fähigkeit murine L-929 Fibrosarkomzellen zu töten her. [2]

1.1.1. TNF α -Rezeptoren

TNF α übt seine Wirkung aus, indem es mit hoher Affinität an spezifische Zelloberflächenproteine bindet, an den TNF α -Rezeptor 1 (TNFR1) und den TNF α -Rezeptor 2 (TNFR2). [3] Der TNFR1 – aufgrund seiner 55kDa als p55-Rezeptor benannt – wird auf fast allen Geweben und Zelltypen exprimiert, wohingegen der TNFR2 vor allem auf Immunzellen und Endothelzellen gefunden werden kann. [4] Die äußere Struktur der beiden Rezeptoren ist nahezu identisch, die interne Struktur unterscheidet sich jedoch deutlich voneinander, so dass eine unterschiedliche Ansteuerung der Signalwege vermutet wurde. Durch Antikörperversuche gegen die jeweiligen Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass nicht TNF α selbst, sondern die Rezeptoren für die verschiedenen Wirkungen von TNF α verantwortlich sind. [5-7]

1.1.2. Zelluläre Wirkungen von TNF α

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die meisten Zellfunktionen von TNF α über den TNFR1 und nicht den TNFR2 gesteuert werden [8, 9], auch aufgrund des unterschiedlichen Expressionsmusters auf den Körperzellen. Nach der Bindung von TNF α an die extrazelluläre Domäne des TNFR1 und der darauf folgenden Dissoziation des „inhibitory protein silencer of deathdomain“ (SODD) von der Intrazellulärdomäne (ICD) des Rezeptors, wird der TNFR1-

ICD Komplex von dem Protein TRADD (TNF α receptor-associated death domain) erkannt. Dieses wiederum rekrutiert weitere Proteine wie RIP (receptor-interacting protein), TRAF2 (TNF α -receptor associated factor 2) oder FADD (Fas-associated death domain), welche Schlüsselenzyme für weitere Signalwege initiieren können. [10]

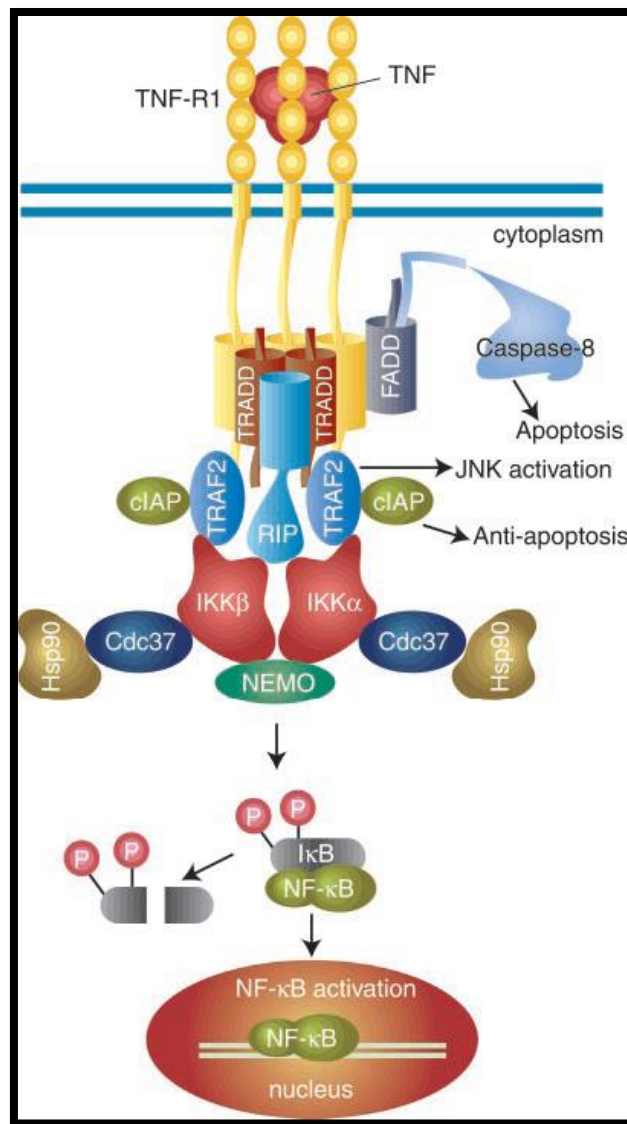


Abbildung 1: TNF α -Signalling

Nach Interaktion von TNF α mit dem TNFR1 kommt es zur Bildung eines Komplexes. Danach kommt es zur Aktivierung weiterer Aktivierungspfade.

Abbildung aus *TNF-R1 Signalling: A Beautiful Pathway*; Guoqing Chen, et al.; *Science* 296, 1634 (2002);

Diese Enzyme sind beispielsweise verantwortlich für die Einleitung der Apoptose (Caspase 8-Rekrutierung durch FADD), es können aber auch Anti-Apoptose-Proteine aktiviert werden (TRAF2 rekrutiert cellular inhibitor of apoptosis Protein1 cIAP-1). [11, 12] Eine weitere Form der TNF α -Wirkung ist die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B oder c-JUN. Die Phosphorylierung von c-JUN geschieht mittels TRAF2-abhängiger Aktivierung von MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase), MEKK1 oder ASK1 (apoptosis-stimulated kinase 1). Hierdurch wird durch eine Kaskade schlussendlich die JNK (c-JUN NH2-terminalkinase) gestartet, welche c-JUN phosphoryliert und ihre Transkriptionsmodulierenden Eigenschaften verändert. NF- κ B wird über die Kinase RIP aktiviert. Hierbei beruht die Wirkung von TNF α darauf, dass Inhibitoren von κ B-Proteinen (I κ B) ubiquitiniert und abgebaut werden. [13-15] Hierdurch kann der nukleäre Faktor aus dem Zytosol in den Zellkern gelangen und dort die Expression von Proteinen fördern bzw. hemmen. Diese sind essentiell für die Regulierung von verschiedenen Prozessen wie Zellwachstum und Apoptose, Reifung, Onkogenese und natürlich Immun- und Stressantwort und Entzündungsreaktionen. TNF α kann also sowohl über unterschiedliche Rezeptoren als auch über verschiedene Signalwege mannigfaltige „positive“ als auch „negative“ Effekte ausüben.

So ist der TNFR1 hauptverantwortlich für die Entwicklung entzündlicher Hautreaktionen [16], aber auch für die Produktion von protektivem NO (nitrous oxide) im Toxoplasmosemodell der Maus. [17]

Unter allen Zellen, welche TNF α - Wirkungen unterworfen sind, sind Endothelzellen eines der Hauptziele. [18] So wird die Induktion der Leukozytenadhäsion [19, 20], proinflammatorischer Cytokine [21, 22], Freisetzung von Fibrin [23, 24] und die Modulation der NO-Bildung unter Anderem durch TNF α gesteuert. [25, 26]

Bei Stimulierung der TNF α -Rezeptoren mittels spezifischer Rezeptor Antikörper stellte man fest, dass durch den TNFR1 alleine die endotheliale Permeabilität durch cytoskelettalen Umbau in vitro gesteigert werden kann, wohingegen auch der TNFR2 in der Permeabilitätssteigerung von Lebergefäßen in vivo eine große Rolle spielt. [18]

1.2. Das Endothel

Die zum Lumen hin gerichtete Schicht der Gefäßwand wird als Endothel (lat. Endothelium) bezeichnet. Ein Mensch besitzt ca. 10000 Milliarden Endothelzellen und die Gesamtfläche beträgt 4000 bis 7000 m². Damit wird das Endothel häufig als größtes Organ des Menschen bezeichnet. [27] Das Endothel selbst ist immer eine einzellige Schicht aus Endothelzellen. Sie stehen in engem Kontakt mit glatten Muskelzellen (SMC), deren Aktivität auch von den Endothelzellen moduliert wird.

Das Endothel hat eine Vielzahl von unterschiedlichen Funktionen wie

- der Regulation von Leukozytenadhäsion,
- die Regulation der Gefäßstruktur durch Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen,
- die Regulation des Gefäßtonus [28]
- die Regulation von Leukozytenadhäsion und Lipid-uptake,
- die Modulierung der Homöostase durch Bildung einer Vielzahl von Faktoren wie dem von-Willebrand-Faktor, Plasminogenaktivator, Plättchen-aktivierendem Faktor oder Thrombomodulin.
- Weitere Funktionen beinhalten den Umbau bzw. den Abbau vasoaktiver Substanzen wie Angiotensin I (durch endothelgebundenes ACE), Bradykinin, Serotonin, ADP, Adenosin oder Noradrenalin. [29]

Das Endothel bildet jedoch auch eigenständig vasoaktive Substanzen wie NO, den endothelium-derived hyperpolarization factor = EDHF [30], Prostaglandine oder Endothelin.

1.2.1. Rolle des Endothels für die Regulation des Gefäßtonus

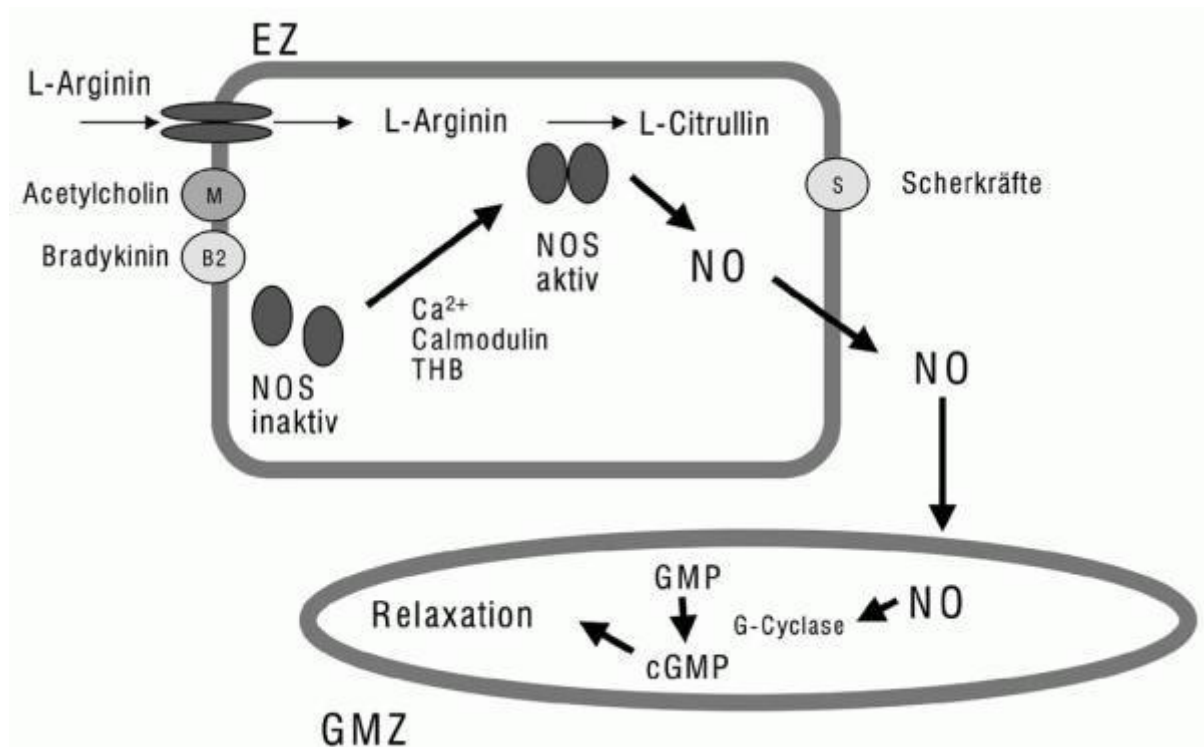


Abbildung 2: Interaktion von Endothelzellen (EZ) mit glatten Muskelzellen (GMZ); Aktivierung der NO-Synthase (NOS) und konsekutive Bildung von NO (nitrous oxide) aus L-Arginin mit nachgeschalteter Relaxation der glatten Muskelzelle auf NO;

Festa A et al. Journal für Kardiologie 2003 10 (10): 409-417

Seit der Entdeckung eines EDRF, welcher später als NO identifiziert wurde, war es evident, dass es vielerlei endotheliale Vasodilatoren und Konstriktoren gibt. Entdeckt wurde NO bereits 1772 durch Joseph Priestley [31] und weitergehend erforscht in den späten 70er Jahren von Furchgott und Zawadski. [30] Ein wichtiger endothelialer Vasokonstriktor wurde in den späten 80er Jahren von Hickey et.al. erforscht; das Endothelin. [32] Die zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus spielt jedoch das primäre EDRF, das NO. [33]

Gebildet wird es von der NO-Synthase (NOS), von der es mindestens drei Subtypen gibt:

- Die eNOS (endotheliale NO-Synthase), welche konstitutiv exprimiert wird,
- Die nNOS (neuronale NO-Synthase), welche auch konstitutiv exprimiert ist und
- Die iNOS (induzierbare NO-Synthase), welche beispielsweise in Makrophagen oder glatten Muskelzellen vorhanden ist und durch Faktoren wie z.B. TNF α oder Endotoxin induziert wird und bis zum 1000fachen der normalen NO-Produktion leisten kann.

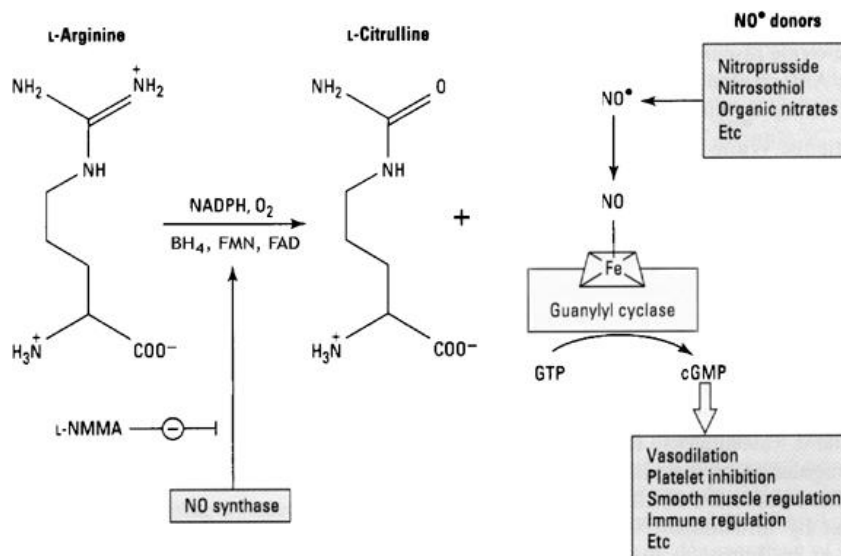


Abbildung 3: Bildung von NO;

NO reagiert mit der Guanylyl-Zyklase zur Bildung von cGMP, welches Effekte wie Vasodilatation oder Plättchenhemmung ausüben kann.

I F Ghalayini, Nitric oxide–cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility, International Journal of Impotence Research 2004 Dec; 16(6):459-69

Die eNOS als Hauptquelle endothelialen NO's bildet aus den Substraten L-Arginin und Sauerstoff in einer zwei Monooxygenierungen umfassenden Reaktion L-Citrullin und NO. [34-36] Durch Versuche mit L-Arginin-Analoga (L-NMMA oder L-NNA), welche als Inhibitoren der NO-Synthese wirken und NO-Knockout-Mäusen wurde die Bedeutung von NO für die Regulation des Gefäßtonus klar nachgewiesen. [37] So führt L-NMMA zur Vasokonstriktion und Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Des Weiteren kam es im Mausmodell zur verstärkten Intimaproliferation, da das ungebremste Wachstum von glatten Muskelzellen nicht mehr durch NO gehemmt werden konnte. Somit wurde der Schluss gezogen, dass im Menschen ein physiologischer NO- Vasodilatator- Tonus herrscht, der die Gefäße in einem erweiterten Zustand hält und für die Regulation des Blutdruckes und des – Flusses essentiell ist. [38] Darüber hinaus hemmt NO die Thrombozyten-Aggregation. [39]

Das Prinzip der Regulation des Gefäßtonus durch das Endothel wurde 1986 erstmals am Patienten erforscht, indem Acetylcholin als Stimulator der endothelialen NO-Synthese infundiert wurde. Hierbei wurde angiographisch eine Vasodilatation der Koronarien beobachtet. [32, 40] Bei Patienten mit Arteriosklerose kam es hingegen zu einer Vasokonstriktion, da durch das geschädigte Endothel das Acetylcholin nicht mehr eine

endotheliale NO-Synthese bewirkte, sondern direkt an den glatten Muskelzellen eine Kontraktion hervor rief. An isolierten arteriosklerotischen Gefäßen wurde bestätigt, dass diese eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit nach Stimulation durch Acetylcholin aufwiesen. [41]

Somit hat das Endothel in sano eine Schlüsselfunktion in der Regulation und Aufrechterhaltung des normalen Gefäßtonus mit sämtlichen daraus resultierenden Folgen.

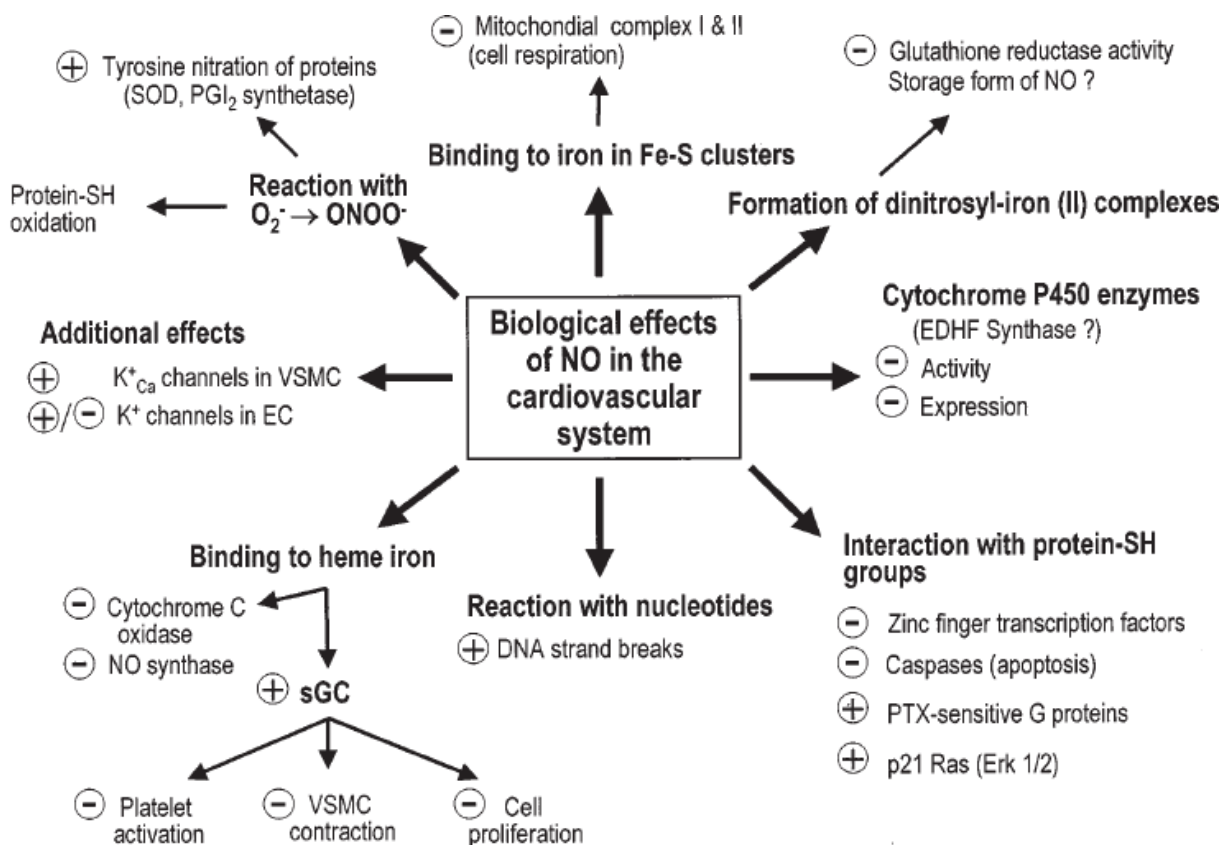


Abbildung 4: Wirkungen von NO auf das Kardiovaskuläre System

Fleming I, Busse R; NO: the primary EDRF; J Mol Cell Cardiol 31, 5-14 (1999)

1.2.2. Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose

Ist das Endothel jedoch geschädigt und kann somit wichtige endotheliale Funktionen nicht ausüben, spricht man von endothelialer Dysfunktion. Klinisch ist dieser Begriff als verminderte NO-Bioverfügbarkeit [42] definiert. Hierbei muss nicht unbedingt die Produktion beeinträchtigt sein, es kann auch durch eine gesteigerte NO-Inaktivierung verursacht sein.

So können „reactive oxygen species“ (ROS) sehr schnell mit anderen physiologisch aktiven Substanzen wie NO reagieren. Hierbei entsteht Peroxynitrit (ONOO-), welches wiederum ein Sauerstoffradikal ist. Um dem entgegenwirken zu können besitzen vaskuläre Zellen Enzyme wie die Superoxiddismutase (SOD), die reaktive Sauerstoffradikale zu H₂O₂ umwandeln kann. [43] Das Problem ist hierbei, dass die Reaktionsrate von Sauerstoffradikalen mit SOD nur ein Drittel der Rate von Sauerstoffradikalen mit NO beträgt. [44] Diese Gratwanderung zwischen Sauerstoffradikalen und NO ist von großer Bedeutung für die Entwicklung der Endotheldysfunktion. [45] So gehen zahlreiche kardiovaskuläre Risikofaktoren nicht nur mit einer verminderten NO Produktion einher, sondern auch mit einer vermehrten ROS-Produktion.

Eine Endotheldysfunktion diesen Sinnes ist in umfangreichen Studien in nahezu allen Risikofaktoren für die Arteriosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen beobachtet [46] worden und somit begünstigt eine Endotheldysfunktion nachgewiesenermaßen die Entstehung und Progression von Gefäßerkrankungen wie z.B. der Hypertonie oder der Arteriosklerose. [27, 47-51]

1.2.3. Rolle von TNF α bei endothelialer Dysfunktion

Ein wichtiger Faktor, welcher die Endothelschädigung begünstigen kann, ist TNF α . In Studien wurde entdeckt, dass TNF α die NOS-Expression und -Aktivität maßgeblich beeinflusst. [52] So haben menschliche aortale Endothelzellen nach achtstündiger TNF α -Stimulation eine vermehrt induzierte iNOS aber eine verminderte eNOS-Expression. [53] Dies wurde durch mehrere Studien mit unterschiedlichen Endothelzellen bekräftigt. [54-57]

Der Effekt der TNF α -vermittelten Endotheldysfunktion wurde auch in vivo gezeigt, z.B. in Mausekoronarien [58], Katzenkarotiden [59] oder im Rind [60]. Picchi et al. zeigten [61], dass

beim metabolischem Syndrom die Endothelfunktion über eine TNF α -vermittelte Sauerstoffradikalproduktion vermittelt wird.

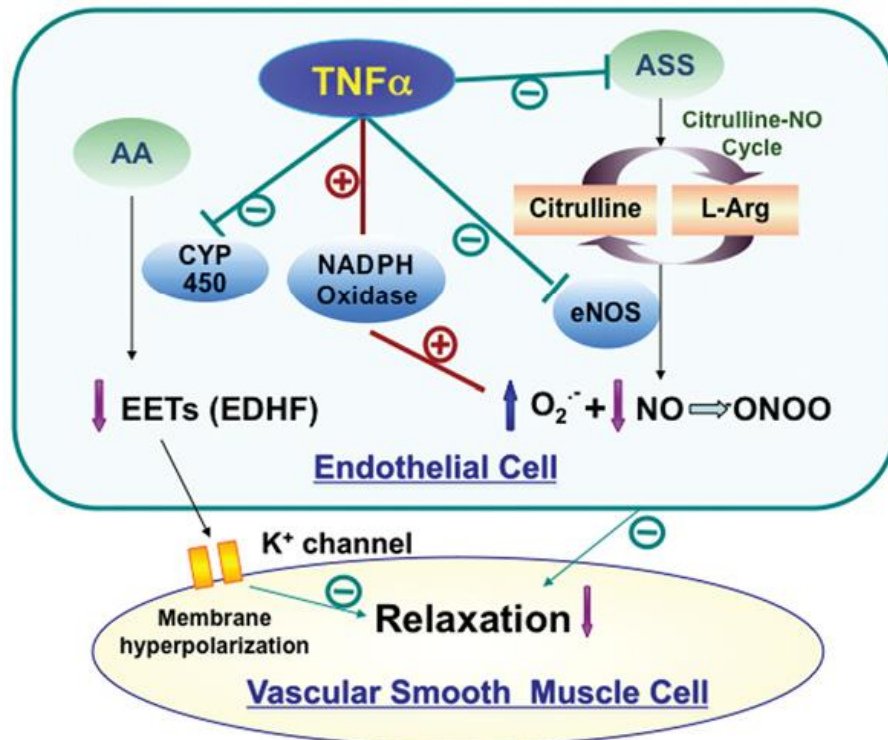


Abbildung 5: Rolle von TNF α bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion

TNF α reduziert die Bildung von NO durch Hemmung der Aktivität der Argininosuccinat-Synthase (ASS) und der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und trägt zum Abfangen von NO durch eine NADPH-abhängige Sauerstoffradikal-Bildung bei. Letztendlich wird so durch TNF α die Bioverfügbarkeit von NO reduziert, so dass es zu einer verminderten Fähigkeit der glatten Muskelzelle zur Relaxierung kommt.

Zhang H, Park Y, et al.; Role of TNF- α in vascular dysfunction; Clin. Sci. (2009)

1.3. Ischämie/Reperfusion (I/R) bzw. Hypoxie/Reoxygenierung (H/R)

Hypoxie ist als Sauerstoffmangel im Gewebe definiert. Dies kann verschiedene Ursachen haben, wie z.B. Gefäßverengungen, verringerte Versorgung von Organen durch Herzinsuffizienz, Thrombosen, Embolie oder andere Faktoren wie Lungenkrankheiten oder Anämie. Wird ein Organ nicht mehr mit Blut und dadurch mit Sauerstoff versorgt, spricht man von ischämischer Hypoxie oder auch Ischämie. In vitro nennt man den Zustand verringerter Sauerstoffzufuhr Hypoxie, in vivo Ischämie. Hierbei kommt es zu vielen Veränderungen in der betroffenen Zelle:

So kommt es zu einem Synthesemangel von Energieträgern wie dem Adenosintriphosphat. [62] Dadurch kommt es zu einem Funktionsverlust der membranständigen ATP-abhängigen Na⁺/K⁺-Kanäle, wodurch es zu einer Elektrolytverschiebung und Wassereinstrom in die Zelle kommt. [63] Eine weitere Folge ist eine Azidose, wodurch die elastischen Eigenschaften von Leukozyten beeinträchtigt werden und diese somit zu einer Kapillarobstruktion führen können. [64]

Wenn im Gewebe wieder Sauerstoff vorhanden ist, spricht man von Reoxygenierung (in vitro) bzw. Reperfusion (in vivo). Hierbei kommt es zu verschiedenen Phänomenen:

Das no-reflow-Phänomen entsteht dadurch, dass durch die bereits angesprochene Kapillarobstruktion die Kapillaren anhaltend nicht perfundiert werden und somit im absteigenden Stromgebiet die Hypoxie mit ihren Folgen anhält. [65]

In den Bereichen, in denen wieder Sauerstoff vorhanden ist, kommt es zum reflow-paradox-Phänomen. [66] Hierbei kommt es zu einer Reoxygenierung des Gewebes, welches zu einer inflammatorischen Leukozytenreaktion führt, so dass vermehrt freie Sauerstoffradikale gebildet werden. Diese wirken toxisch, indem sie zu einer Lipidperoxidation und dadurch zu Membran- und Gewebeschäden führen. [67] Hierbei spielen vor allem reaktive Sauerstoffradikale eine Rolle, die denaturierend auf Proteine wirken. [68, 69] Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass durch Gabe antioxidativer Substanzen wie Vitamin E oder Katalase die Bildung radikalbedingter biochemischer Veränderungen verhindert und der Ischämie/Reperfusionsschaden reduziert werden konnte. [70] Der direkte Nachweis von ROS ist auch direkt mittels Elektronen-Resonanz-Spektrometrie oder Chemilumineszenz gelungen. [71, 72]

Neben der Radikalbildung kommt es zu einer vermehrten Adhärenz von Leukozyten, einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität, der Freisetzung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und ICAM-2 endothelseits, CD11 /CD 18 leukozytenseits oder von Mediatoren wie Interleukin-2, IL-6, IL-10 und TNF α , [73] so dass es insgesamt zu postischämischen Schäden durch die Störung der Membranintegrität kommt.

So konnte in vielen Studien nachgewiesen werden, dass nach Ischämie/Reperfusion im murinen Herzen es zu einer bis zu vierfach vermehrten Bildung von TNF α kommt und dass nach Blockade von TNF α mittels Antikörpern der I/R-Schaden signifikant geringer ausfällt. [1, 74, 75]

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNF α - Hemmer den Reperfusionsschaden beim Myokardinfarkt im Mausmodell vermindern können. [76]

Es zeigt sich, dass I/R mit der daraus resultierenden Endothelschädigung klinisch von außerordentlicher Relevanz bei Krankheitsbildern wie pAVK, Schlaganfällen oder Myokardinfarkten ist und von großer wirtschaftlicher Bedeutung bei diesen „Volkserkrankungen“ ist.

1.4. Fragestellung

Aus den vielfältigen Funktionen des Endothels und dem Zusammenhang der Endotheldysfunktion mit zahlreichen Krankheiten wie der Arteriosklerose, wird seine Schlüsselfunktion deutlich. Es ist bereits bekannt, dass I/R das Endothel nachhaltig schädigen kann und Mediatoren wie TNF α freigesetzt werden. Es wurde hierbei jedoch noch nie untersucht, welche Rolle die verschiedenen TNF α -Rezeptoren bei Ischämie/Reperfusionsschaden (IRS) -bedingter TNF α -Ausschüttung besitzen, um auf diese Weise die molekularen Grundlagen der Endothelschädigung zu verstehen, um so eventuell die Endothelschädigung minimieren zu können.

Aus diesem Grund wurden folgende Fragestellungen behandelt:

- Welche TNF α -Rezeptoren sind auf humanen Endothelzellen vorhanden?
- Welche TNF α -Rezeptoren sind im Mausmodell vorhanden?
- Bildet das Endothel nach Ischämie/Reperfusion in vitro Sauerstoffradikale?
- Hat der TNF α -Rezeptor-1 Einfluss auf die Radikalproduktion nach I/R in vitro?
- Welchen Einfluss hat Ischämie/Reperfusion auf die Endothelfunktion in vivo im Cremaster-Mikrozirkulationsmodell in Wildtyp- und TNF α -Rezeptor-Knock-Out-Mäusen?
- Kann man durch Minderexpression des TNFR1 in vivo im Cremaster-Mikrozirkulationsmodell den Endothelschaden beeinflussen?

Zu diesem Zwecke wurden in vitro verschiedenste Methoden und in vivo das Cremastermodell der Maus angewandt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere und Versuchshaltung

Die Versuche wurden an männlichen Tieren aus zwei unterschiedlichen Mausstämmen durchgeführt. Es wurden Tiere aus den Zelllinien C57Bl/6 und TNF α -Rezeptor1- (TNFR1 $^{-/-}$), TNF α -Rezeptor2- (TNFR2 $^{-/-}$) und TNF α -Rezeptor1/2- (TNFR1/2 $^{-/-}$) Knockout mit C57Bl/6 Hintergrund verwendet.

Die TNFR-KO Zuchtpärchen wurden uns freundlicherweise von Herrn PD Dr. Volker Vielhauer (Medizinische Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der LMU München) zur Verfügung gestellt. Die TNFR1 $^{-/-}$ und TNFR2 $^{-/-}$ stammen ursprünglich aus dem Jackson-Labor. (Bar Harbor, ME, USA) Die TNFR1/2 $^{-/-}$ -Tiere wurden durch Kreuzung aus Mäusen eines C57BL/6J-Hintergrundes mit jeweils einem defizienten TNF α -Rezeptor erzeugt. [77]

Die Tiere hatten ein Gewicht zwischen 19 und 26 Gramm und waren 8-13 Wochen alt. Die Mäuse wurden in der Versuchstierhaltung der LMU München, Walter-Brendel-Zentrum, LMU München, gehalten. Sie wurden in IVC -Käfigen mit maximal vier Mäusen pro Käfig und freiem Zugang zu Standardtrockenfutter und Wasser gehalten. Sie lebten in einer Atmosphäre mit 24°C Raumtemperatur und einer Luftfeuchtigkeit von 50%. Alle Versuche erfüllten die Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes laut Paragraph 1, 2 und 2a und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2. Narkose

Die Mäuse wurden auf einer Kleintierwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland, Model BP 410S,) gewogen und gewichtsadaptiert mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Das Narkosegemisch setzte sich wie folgt zusammen: (in der Endkonzentration pro Gramm Maus)

- Midazolam 8mg/l
- Medetomidin 200mg/l
- Fentanyl 20mg/l

In 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt.

Die Narkose wurde eingeleitet indem jeder Maus von diesem Gemisch initial 15 μ l per Gramm Maus intraperitoneal injiziert wurden. Nach ca. 10 Minuten erreichten die Mäuse das Toleranzstadium, welches mechanisch mittels Pusten oder Zwicken überprüft wurde. Während der Versuche wurde die Narkose durch intravenöse Nachtitration von Narkotika aufrechterhalten. Hierzu wurde über einen vorher angelegten Vena –Jugularis-Interna Katheter mittels eines Perfusors (Infors, Einsbach, Deutschland, Model Precidor Type 5003) kontinuierlich Narkose der Menge 0,1-0,2 ml/min/kg infundiert.

Nach Beendigung der Versuche wurden alle Tiere durch eine i.v. Bolusinjektion von 30 μ l Pentobarbital der Konzentration 1,6 mg/ml eingeschläfert.

2.3. Versuchsvorbereitung und Katheterisierung

Nach dem Wirkeintritt der Narkose wurden alle Tiere mittels eines Langhaarschneiders (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland, Model Favorita II) im Brust- und Hals- sowie im Bereich des rechten Skrotums rasiert und mittels einer Enthaarungscreme der Marke Pilca von Resthaaren befreit. Anschließend wurden sie rücklings auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Medax, Kiel, Deutschland, Model 12511) überführt und mittels Klebeband (3M, Landsberg am Lech, Deutschland, Model Durapore) an den Vorderläufen fixiert. Sämtliche Präparationen wurden unter Zuhilfenahme eines OP-Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland, Model Stemi 2000-CS) und fein-präparatorischen Instrumenten (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurde mittels einer um die Frontzähne gelegten Klemme der Kopf überstreckt und die Präparation durch einen median



Abbildung 6: Aufbau des Präparierarbeitsplatzes mit OP-Mikroskop, OP-Tisch und mikrochirurgischen Instrumenten

geführten Schnitt mit dem Skalpell begonnen.

Nach Auffinden der rechten Vena Jugularis wurde diese mittels drei Seidenfäden gespannt und nach Klemmung (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) inzidiert, so dass ein Polyethylenkather (Solomon Scientific, Illinois, USA, Model PE 0.28mm ID, 0.64mm OD) mit ca. 40 Zentimeter Gesamtlänge ca. 8mm tief in das Gefäß eingebracht werden konnte, der nun mit Hilfe der vorgelegten Seidenfäden fixiert wurde. Die korrekte Lage wurde durch Aspiration von Blut überprüft. Von diesem Zeitpunkt an wurde die Narkose wie zuvor beschrieben intravenös fortgeführt.

2.4. Präparation des Musculus Cremaster

Die Präparation des Musculus Cremaster und sämtliche Versuche fanden auf einer eigens dafür angefertigten Plexiglas-arbeitsbühne mit Deckgläschen und Strahlengang für die Mikroskopie statt, auf welcher später der Cremaster untersucht werden konnte. Weiterhin lag die Maus auf einer mittels Rändelschrauben höhenverstellbaren Wärmeplatte (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland), so dass die Kerntemperatur der Maus immer konstant blieb.

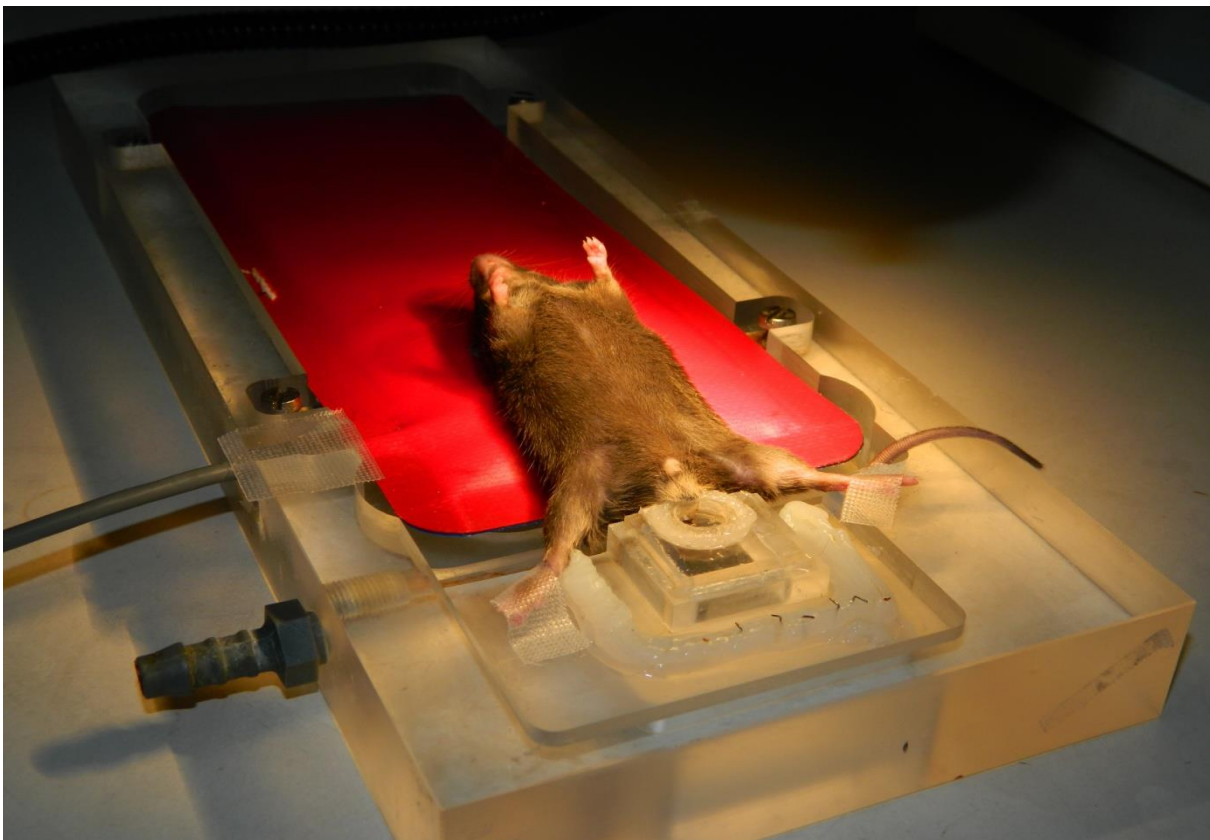


Abbildung 7: Lagerung der narkotisierten Maus auf der Wärmeplatte vor Anlage des Jugularis-Katheters und anschließender Präparation des Musculus cremaster

Die Präparation wurde nach einer erstmals 1973 beschriebenen Methode [78] mit geringen Modifikationen durchgeführt. Das rechte Skrotum wurde mittels eines Skalpell's inzidiert und mit einer Präparierschere streng subkutan eröffnet. Der nun freiliegende Cremasterpol wurde mit einem atraumatischen Prolene-faden der Stärke 6-0 angeschlungen und senkrecht zum Skrotum aus dem Skrotalsack angehoben. Nun wurde das umliegende Bindegewebe atraumatisch und stumpf vom Cremastermuskel entfernt. Danach wurde der Cremaster auf das Deckgläschen der Plexiglas-arbeitsbühne gelegt und mit dem Faden an einer das Deckgläschen umgebenden Silikonummantelung befestigt. Anschließend wurde der Cremaster an der weitgehend gefäßfreien ventralen Seite inzidiert und bis zur Basis hin eröffnet. Der Muskel wurde dann mit insgesamt 6 Einzelknopfnähten an dem Silikonring so fixiert, dass er flach auf dem Deckgläschen zum Liegen kam. Die Bindegewebsfaszie, die Skelettmuskel, Hoden und Nebenhoden miteinander verbindet, wurde durchtrennt und der Hoden mit Nebenhoden in die Bauchhöhle zurückgeschoben. Vor Beginn der Versuche wurde mittels Rändelschrauben die Höhe des Mauskorpus gegenüber dem Deckgläschen so eingestellt, dass der Cremasterstiel nicht eingeklemmt war, sondern frei schwebte.



Abbildung 8: Nach Inzision des Skrotums wird der Cremaster-Muskel vorsichtig unter Abpräparation von Bindegewebe freigelegt und inzidiert.



Abbildung 9: Darstellung des Musculus Cremaster nach Fixierung mittels Fäden oder hier Metall-Pins am außen liegendem Silikonstreifen. Es ist die Aufzweigung der Hauptarterie mit Begleitvenen in ihre Generationen deutlich zu erkennen

2.5. Superfusionsaufbau

Vom Zeitpunkt der Eröffnung des Skrotums bis zum Ende der Versuche wurde der Cremaster mit erwärmter, pH- äquilibrierter (pH=7,4) Krebs- Henseleit-Lösung (35°C) folgender Zusammensetzung superfundiert:

143 mmol/L	Na ⁺
6 mmol/L	K ⁺
2,5mmol/L	Ca ²⁺
1,2mmol/L	Mg ²⁺
128 mmol/L	Cl ⁻
25 mmol/L	HCO ₃ ⁻
1,2mmol/L	SO ₄ ²⁻
1,2mmol/L	H ₂ PO ₄ ⁻

Das Superfusionssystem bestand aus einem Vorratsbehältnis, welches in ein nachgeschaltetes System aus einer Rollerpumpe (Ismatec, Wertheim, Deutschland, Model MS-REGLO) und einem digital justierbarem Wasserbad (JULABO, Seelbach, Deutschland, Model ED) mündete, so dass die Flussgeschwindigkeit und die Temperatur genau eingestellt werden konnte. Die Endtemperatur auf dem Cremastermuskel betrug 35°C. Mittels einer Rollerpumpe konnten dem Superfusat lokal zu applizierende Substanzen in der gewünschten Endkonzentration zugeführt werden. Die in dieser Arbeit angegebenen Konzentrationen sind die auf dem Cremastermuskel erreichten Endkonzentrationen. Die Zirkulation war durch eine in der Arbeitsbühne integrierte Ablaufrinne gegeben, durch welche die Lösungen kontinuierlich abgeleitet und in einem Behältnis am Boden gesammelt wurden. Alle Lösungen wurden frisch vor dem Versuch jeweils neu hergestellt.

2.6. In-Vivo-Mikroskopie

Das auf dem Deckgläschen liegende Präparat wurde mittels eines binokularen Mikroskops (Zeiss, Oberkochen, Deutschland, Model Axiotech) unter Durchlicht betrachtet. Mit einer Videokamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan, Model C8484-05G), welche mit einem leistungsstarken Computer verbunden war, konnte das Bild mittels der Zeiss Software AxioVision jederzeit live mitgeschnitten bzw. anschließend bearbeitet werden. Es wurde ein Immersionsobjektiv (Zeiss, Oberkochen, Deutschland, Model 440049) der Vergrößerung 20x verwendet, so dass die endgültige Vergrößerung 200fach betrug. Zur späteren Datenauswertung wurden während dem Versuch von jedem Versuchsabschnitt Bilder aufgenommen und archiviert. Die Durchmesserbestimmung erfolgte durch ein in die Software integriertes Tool, welches einmalig mittels einer mitgelieferten Schablone geeicht werden musste.



Abbildung 10: In-vivo-Mikroskopie-Arbeitsplatz mit angeschlossenem Kamera- und Computersystem. Hier liegt gerade eine Maus mit Rückenhautkammermodell auf

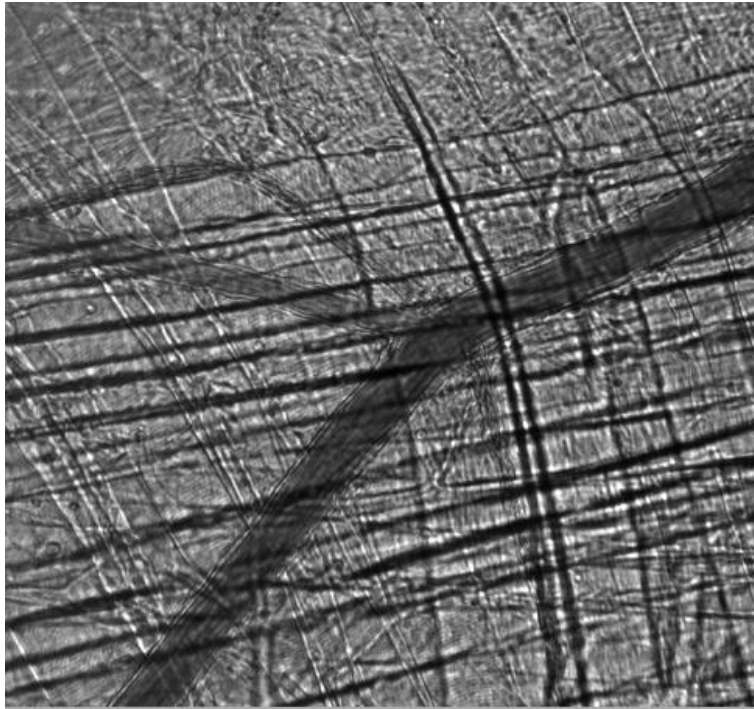


Abbildung 11 Bild des Musculus Cremaster unter dem In-Vivo-Mikroskop

Hier ist eine Arteriole mit Aufzweigung in die dritte Gefäßgeneration zu sehen. Es liegt Durchlicht mit einem 20er Wasserobjektiv vor. Hier Ruhebedingung mit Superfusion von Krebs-Henseleit-Lösung.

2.7. Anlegen der Ischämie und Reperfusion

Zur Untersuchung der Effekte nach Ischämie/Reperfusion wurde die Blutzufuhr des Cremaster durch Anlegen einer atraumatischen Gefäßklemme mit extra langen Backen (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) am Cremasterstiel unterbrochen. Das Sistieren des Blutstromes wurde intravitalmikroskopisch überprüft und nach einer Stase- bzw. Ischämiezeit von einer Stunde die Klemme entfernt. Nach 1h Reperfusion wurden die Versuche wie folgt fortgeführt.

Während der Ischämie- und Reperfusionszeit wurde der Cremaster durch Superfusion vor der Austrocknung bewahrt.

2.8. Versuchsablauf

Zur Bestimmung der Dilatationskapazität wurde zuerst nach Einhaltung einer Äquilibrationsphase von 30 Minuten der Ruhedurchmesser von 5-10 Arteriolen bestimmt. Im Folgenden wurden fünf verschiedene Konzentrationen von Acetylcholin (10^{-7} , $3 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $3 \cdot 10^{-6}$ und 10^{-5} mmol/l) gelöst in Krebs-Lösung lokal über den Cremastermuskel superfundiert und nach einer Einwirkzeit von 40 Sekunden der Durchmesser der zuvor ausgewählten Arteriolen bestimmt.

Nun wurde wie zuvor beschrieben eine Periode der Ischämie bzw. Reperfusion durchlaufen, nach der der eben beschriebene Versuchsablauf wiederholt wurde.

Nach der höchsten Acetylcholinkonzentration wurde der maximale Durchmesser durch lokale Applikation eines lytischen Cocktails bestimmt. Dieser bestand aus:

- Acetylcholin (10^{-4} M)
- Adenosin (10^{-6} M)
- SNP (10^{-4} M)

Die Konzentrationsangaben entsprechen der Endkonzentration.

2.9. Zellkultur

2.9.1. Kultivierung von Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC)

HMEC Medium:	Medium 199 mit 10% Kälberserum und 1% <i>EndothelialCell Growth Medium</i> , 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin
Trypsin / EDTA:	0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% EDTA
PBS-	Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ : 160 mMNaCl, 2,7 mMKCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄

Die Kultivierung der HMEC's, welche von Ades et al. Zur Verfügung gestellt wurden [79], erfolgte im HMEC Medium im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre aus mit Wasserdampf gesättigter Raumluft und einem CO₂-Anteil von 5%. Das Medium wurde täglich gewechselt. Bei Erreichen des Konfluenzstadiums (100% Zellbewuchs der Schale) wurden die Zellen subkultiviert. Hierbei wurden die Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zuerst mit PBS- gewaschen. Jetzt wurden die Zellen durch 2-4 minütige Zugabe von Trypsin/EDTA und leichtes Beklopfen der Zellschale (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Model 83.1802) abgelöst. Die Zellen wurden nun im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 in HMEC-Medium aufgenommen und auf neue Kulturschalen verteilt.

2.9.2. Zell-Lyse

RIPA-Lysispuffer	150mM NaCl, 50mM Tris-Base, 1mM NaF, 1mM EDTA, 1% Nonidet P40, 0,1% SDS, 0,25% Desoxycholat, 1 μ M Pepstatin, 1 μ M PIC, 1mM aktiviertes Na ₃ VO ₄
------------------	--

Die Proteine zur Bestimmung der TNF α -Rezeptoren der HMEC's wurden gewonnen, indem konfluente Zellkulturschalen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Diameter 60 mm) zweimal mit eiskaltem PBS- gewaschen und nach Zugabe von 100 μ l eisgekühltem Lysispuffer bei -20°C tiefgefroren wurde. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Lysat durch viermaliges Auf- und Abziehen mit einer 29 Gauge Nadel homogenisiert und in Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden diese mit 14000 G zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein Teil davon wurde für eine Proteinbestimmung verwendet.

2.9.3. Proteinbestimmung

Protein Test-Reagenz A	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts; Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA-detection reagent und Natriumtartrat in 0,1N Natriumhydroxid
Protein Test-Reagenz B	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts
BSA Lösung	1 mg / ml

Für die Proteinbestimmung wurden alle Proben sowie die Eichgerade in Triplets zu je 10 μ l auf 96-well-Platten aufgetragen. Die beiden Protein-Assay- Reagenzien wurden im Verhältnis 1:50 vermischt und hiervon jeweils 200 μ l den Proben zugegeben. Die Platte wurde nun luftdicht verschlossen und im Brutschrank bei 37°C eine halbe Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben photometrisch bei 550nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte nun der Proteingehalt der Proben errechnet werden.

2.9.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3-fach-Samplepuffer	0,5M Tris-HCl pH 6,8; SDS, Glycerol, Bromphenolblau, Wasser, 5% Mercaptoethanol
10% Trenngel	5ml 30%ige Polyacrylamidlösung, 3,75ml 1,5M Tris-HCl pH 8,8, 0,15ml 10%iges SDS, 6,1ml Wasser, 15 μ l TEMED, 75 μ l 10ige APS
Sammelgel	1,7 ml 30%ige Polyacrylamidlösung, 1ml 1,25M Tris-HCL pH 6,8, 100 μ l 10%iges SDS, 7ml Wasser, 20 μ l TEMED, 100 μ l 10%ige APS
Elektrophorese- Puffer	15g Tris-Base, 72g Glycin, 5g SDS ad. 1000ml Wasser

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10%igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Zur Herstellung des Gels wurden die Ingredienzien gemäß obigem Rezept ohne TEMED und APS zugegeben und ca. 15 Minuten entgast. Dann wurden TEMED und APS hinzugefügt und der Ansatz zwischen zwei Glasplatten gegossen, die durch zwei 1mm dicke Spacer voneinander getrennt waren. Nach ca. 25 Minuten war der Ansatz, welcher mit H₂O gesättigten Isobutanol überschichtet war, auspolymerisiert. Nach dem

Auswaschen des Alkohols wurde das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet, welches gemäß obigem Rezept nach dem gleichem Prinzip hergestellt wurde. In das noch flüssige Gel wurde ein Probenkamm gesteckt und bis zum Aushärten desselben belassen. Die so entstandenen Probentaschen wurden mit H₂O gründlich gespült und anschließend mit den Proben unter Zuhilfenahme einer Hamilton-nadel beschickt. Die Proben wurden zuvor für die Elektrophorese vorbereitet, indem der Samplepuffer gemäß der Lysatmenge zugegeben und das Gemisch bei 95°C für 5 Minuten gekocht wurde.

Die Auftrennung selbst erfolgte im Elektrophoresepuffer bei einer Spannung von 100V im Sammelgel und 200V im Trenngel.

2.9.5. Wet- Blotting

Transferpuffer 25mM Tris-Base, 200mM Glycin, Methanol, Wasser

Anschließend wurden die Banden mittels Wet -Blotting auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Hierfür wurde die Membran in Transferpuffer getränkt und eine Kassette gemäß folgender Reihenfolge in einem Pufferbad gerichtet:

- 1.Kassette schwarze Seite
- 2.Schwamm
- 3.Filterpapier
- 4.Gel
- 5.Membran
- 6.Filterpapier
- 7.Schwamm
- 8.Kassette rote Seite

Nun wurde die Kassette in die Tankblot-Apparatur (Peqlab, Erlangen, Deutschland, Model 52-WEB-10) gesteckt und für 120min. bei 50V belassen. Dadurch wurden die Proteinbanden elektrophoretisch gemäß der Stromrichtung auf die Membran übertragen.

2.9.6. Nachweis von TNF α -Rezeptor 1 mittels spezifischer Antikörper und Chemilumineszenz

Waschpuffer	25mM Tris-Base, 190mM NaCl, 0,5ml/l Tween, ad H ₂ O dest.
Blocklösung	5% Milchpulverlösung in Waschpuffer
Erstantikörper	Cell Signalling, Cambridge, UK, anti-TNFR1 in Waschpuffer
Zweitantikörper	Cell Signalling, Cambridge, UK, anti-rabbit
Entwicklerlösung	4,5ml H ₂ O, 0,5ml 1M Tris-Base, 50 μ l Luminol (0,44g/10ml), 22 μ l p-Coumarsäure (0,15g/10ml), 3 μ l H ₂ O ₂

Der Nachweis des TNF α -Rezeptors 1 erfolgte mittels spezifischer Antikörper. Hierfür wurde die Membran zuerst mit Blocklösung für 30 Minuten unter ständigem Schütteln behandelt, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu besetzen. Anschließend wurde der Blot 3x 15 Minuten mit Waschpuffer gewaschen.

Nun wurde der Erstantikörper zugegeben und unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrte mit jeweils 15 Minuten Dauer. Die vom Erstantikörper gebundenen Proteine konnten nun indirekt durch den Zweitantikörper, welcher an den Erstantikörper bindet und eine Peroxidasereaktion auslöst, detektiert werden. Dafür wurde der Blot nun mit dem Zweitantikörper eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Das Waschen danach erfolgte erneut nach dem oben genannten Prinzip. Anschließend konnte der Blot entwickelt werden.

Hierfür wurde die Entwicklerflüssigkeit gemäß obigem Rezept gemischt und erst am Ende das H₂O₂ zugegeben. Nun wurde der Entwickler eine Minute auf dem Blot belassen. Nachdem er zwischen zwei Folien sorgsam ausgestrichen war, wurde der Blot in eine Dunkelkammer (GE Healthcare, München, Deutschland, Darkbox Type 4) mit integrierter Kamera gelegt und 5 Minuten aufgenommen. Durch die Peroxidasereaktion des Zweitantikörpers mit dem Entwickler entstanden nur dort Photonen, wo der Erstantikörper das gesuchte Protein gebunden hatte.

2.9.7. Posttranskriptionelles Gen-Silencing mittels Magnetofektion

Oligonukleotide:

Ctrl-siRNA	Quiagen, Venlo, Niederlande, HP GenomeWide siRNA, Order No 2111590
TNFR1-siRNA	Quiagen, Venlo, Niederlande, TNFR1A_5 validated siRNA si-NR: 00301945
Transfektions- Kit	Quiagen, Venlo, Niederlande, Effectene- Transfection-kit, Cat. No. 301427
Magnetpartikel	Chemicell, Berlin, Deutschland, combiMAG-NC

Um den Effekt vom TNF α -Rezeptor 1 zu untersuchen, mussten Zellen hergestellt werden, die diesen weniger bzw. überhaupt nicht mehr exprimieren.

Zu diesem Zwecke wurden die Zellen mittels Effectene- Transfektion behandelt. Hierbei werden siRNA's (small interfering RNA) verwendet, welche 22 Basen lang sind und an die mRNA für den TNFR1 in der Zelle binden können und diese somit nicht mehr translatierbar sind und von RNAsen abgebaut werden. Da jegliche Transfektion eine Schädigung für die Zelle darstellt, sollte man die Transfektionszeit so gering wie möglich halten, um keinen letalen Reiz auszuüben. Deswegen wurde die Methode der Magnetofektion gewählt, weil die Zellen so kürzer behandelt werden konnten und so der zelltoxische Effekt der Transfektionsreagenzien geringer war. Dafür werden im Transfektionsansatz Magnetnanopartikel an die siRNA gebunden.

Zuerst wurde der Transfektionsansatz nach folgendem Schema pipettiert:

(entspricht der Transfektionsmenge für 1 well einer 24-well Platte, Volumen 400 μ l, davon Transfektionsansatz 200 μ l)

siRNA Endkonzentration 50nM	1 μ l
EC-Puffer	28 μ l
Enhancer	2,08 μ l
Magnetpartikel(combiMAG1mg/ml)	0,52 μ l

Alle Materialien wurden auf Eis gelagert.

Nach diesem Schritt wurde der Ansatz für eine Sekunde in einem Vortex-Mixer gemischt und anschließend bei Raumtemperatur für 3-5 Minuten inkubiert.

Nun wurden 2,6 μ l Effectene beigemischt und das Ganze nach zehn- sekündigem Schütteln erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während dieser Zeit wurde das Zellkulturmedium der zu behandelten Platte abgesaugt und pro Well 200 μ l frisches Medium zugefügt.

Nach den 10 Minuten Inkubationszeit wurde dem Transfektionsansatz 162,28 μ l Zellkulturmedium zugefügt, so dass das Gesamtvolumen des Ansatzes 200 μ l war. Nun wurden 200 μ l von diesem Ansatz in jedes Well pipettiert, so dass insgesamt in jedem Well 400 μ l waren.

Die Platte wurde nun für 30 Minuten auf einen starken Magneten in einem Inkubator gelegt, so dass durch die Wirkung des Magneten die Magnetpartikel mit der gebundenen siRNA an den Zellen wirken konnte.

Nach der Transfektionszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS+ gewaschen und pro well 400 μ l 1% HMEC-Medium zugefügt.

Nach 24h Verweildauer im Inkubator wurden die Versuche durchgeführt.

2.9.8. Hypoxie/Reoxygenierung mittels Hypoxiekammer

HMEC Medium:	Medium 199 mit 10% Kälberserum und 1% <i>EndothelialCell Growth Medium</i> , 0,006% (w/v) Penicillin, 0,013% (w/v) Streptomycin
Hypoxiegas	Linde, München, Deutschland, 5% CO ₂ , 95% N ₂

Zur Schaffung einer hypoxischen Atmosphäre, wurde eine luftdichte Hypoxiekammer (Billups Rothenburg, Deutschland, Modular Incubation Chamber, 5452414) verwendet. Hierfür wurde das Medium zuvor für mindestens 12 Stunden in einem offenen Gefäß in der Hypoxiekammer im Inkubator belassen, damit sich der Sauerstoffpartialdruck im Medium auf hypoxische Konzentrationen sinkt. [80]

Anschließend wurde das Medium der Zellen gegen das gerade beschriebene hypoxische Medium getauscht und die Platte ohne Abdeckung in die Hypoxiekammer gelegt. Nach dem luftdichten Verschluss wurde die Kammer für 3 Minuten mit einem Fluss von 20l/min. geflutet, bevor sowohl der Zu- als auch der Abfluss der Kammer verschlossen wurden und die Kammer für die gewünschte Hypoxiezeit in den Inkubator gestellt wurde.

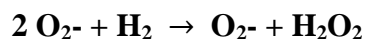
Nach der Hypoxiezeit wurde die Platte aus dem Inkubator genommen und das Hypoxiemedium gegen normales oxygeniertes Zellkulturmedium gewechselt und die Platte für die gewünschte Reoxygenierungszeit in den Zellinkubator gestellt.

2.9.9. Superoxidradikalmessung mittels Cytochrom- C- Reduktions Assay

L-NNA	Enzo Life Sciences, Farmingdale, New York, USA, Product No. 106-014-M005
SOD	Sigma, St. Louis, MO, USA, 4000 U/ml, bovine Erythrozyten Zellkultur- getestet
Cytochrome C	Sigma, St. Louis, MO, USA, from horse heart, C7752-500MG
DMEM	Sigma, St. Louis, MO, USA, D6046

Zur Messung der Superoxidradikalbildung wurde der Cytochrom-C-Assay verwendet. Cytochrom C enthält Fe³⁺-Ionen, die durch Sauerstoffradikale zu Fe²⁺-Ionen reduziert werden. Dies bewirkt eine Farbänderung, welcher im Photometer bei der Wellenlänge $\lambda=550\text{nm}$ gemessen werden kann.

Da jedoch Cytochrom C auch radikalunabhängig reduziert werden kann, muss ein Vergleichsansatz von jeder Probe gemessen werden, dem das Enzym Superoxiddismutase beigefügt wird. Dieses katalysiert die Reaktion:



Da die Superoxidradikalbildung als derjenige Teil der Radikalproduktion definiert war, der durch SOD inhibierbar ist, muss man, um die eigentliche Menge an gebildeten Radikalen zu erhalten von der Reaktion ohne SOD die Reaktion mit SOD abziehen.

$$\text{ROS} = (\text{ohne SOD}) - (\text{mit SOD})$$

Die Absorptionsdifferenz, angegeben in RLU (=relative light units), kann mittels des molaren Extinktionskoeffizienten ($E_{550\text{nm}}=2,1 \times 10^4 \text{ [mol/L]}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Massey, 1959; McCord *et* Fridovich, 1969)) in nmol O₂⁻ umgerechnet werden.

Die Versuche wurden konsequent unter Präsenz von L-NNA durchgeführt, weil L-NNA sowohl reversibel die nNOS und eNOS als auch schnell reversibel die iNOS hemmt. So

wurde vermieden, dass die gebildeten Sauerstoffradikale durch die NOS bzw. das gebildete NO abgefangen werden.

(NO reagiert mit O₂⁻ zu ONOO⁻)

Die Versuche wurden bei Zellen des Konfluenzstadiums 100% durchgeführt, welche zuvor für 24 Stunden in Hungermedium belassen wurden. Ferner wurde darauf geachtet, keine Komponenten zu verwenden, welche Alkohol oder DMSO enthalten, da diese als Radikalfänger wirken. Als Medium diente farbloses DMEM ohne Serum- oder Antibiotikazusätze.

Das Reaktionsvolumen betrug stets 400 μ l/well.

Es wurden zwei verschiedene Reaktionsansätze hergestellt:

- Einer mit Medium, welches zuvor für 30 Minuten im Inkubator pH -äquilibriert wurde und dem L-NNA in der Endkonzentration 200 μ M zugefügt wurde und
- Ein Hypoxie-Ansatz, welcher mit dem zuvor beschriebenen Hypoxie-Medium hergestellt wurde und dem auch L-NNA in der Endkonzentration 200 μ M beigesetzt wurde.

Nun wurden den 24-well-Platten, in denen die Zellen unter Hypoxie-Reoxygenierungsbedingungen untersucht werden sollten, mit dem begasten Medium (+L-NNA) bestückt und wie zuvor beschrieben in die Hypoxiekammer gelegt und für eine Stunde im Inkubator belassen. Zeitgleich wurde die Normoxie Platte mit dem normoxischem Medium bestückt und für eine Stunde in den Inkubator gestellt.

Während der Hypoxiezeit wurde das Reoxygenierungsmedium hergestellt, von dem es auch zwei Ansätze gab:

- L-NNA (200 μ M), Cytochrome C 0,5mg/ml, SOD (200U/ml) in DMEM
- L-NNA (200 μ M), Cytochrome C 0,5mg/ml, in DMEM, statt SOD wurde mit gleichem Gesamtvolumen PBS+ zugegeben.

Nach der Hypoxiezeit wurde das Medium abgesaugt und so die beiden Ansätze zugegeben, dass es von jedem Well mit SOD- Medium ein Vergleichswell mit Medium ohne SOD gab.

Nach einer Reoxygenierungszeit von 60 Minuten wurde die Reaktion gestoppt, indem das Medium in Küvetten (Sigma, St. Louis, MO, USA, Model Plastibrand) überführt wurde und anschließend im Photometer bei 550nm Wellenlänge wie oben beschrieben ausgemessen wurde.

2.10. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden mittels der SigmaStat Version 3,5 durchgeführt. Normal verteilte Daten wurden mittels des Student-T-Testes verglichen, wohingegen nicht normal verteilte Gruppen mittels des Mann-Whitney-Rank-Sum-Testes ausgewertet wurden. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Präsenz der TNF α -Rezeptors 1 in HMEC's und Wirkung der Magnetotransfektion

Um die Effekte des TNF α -Rezeptors 1 auf die Endothelfunktion zu untersuchen, musste zuerst deren Präsenz in den untersuchten Endothelzellen überprüft werden. Weiterhin wurde untersucht, ob der Rezeptor durch die Methode der Magnetotransfektion mittels siRNA in seiner Expression gehemmt werden kann. Ferner wurde eine Testreihe durchgeführt um die optimale Transfektionszeit zu ermitteln.

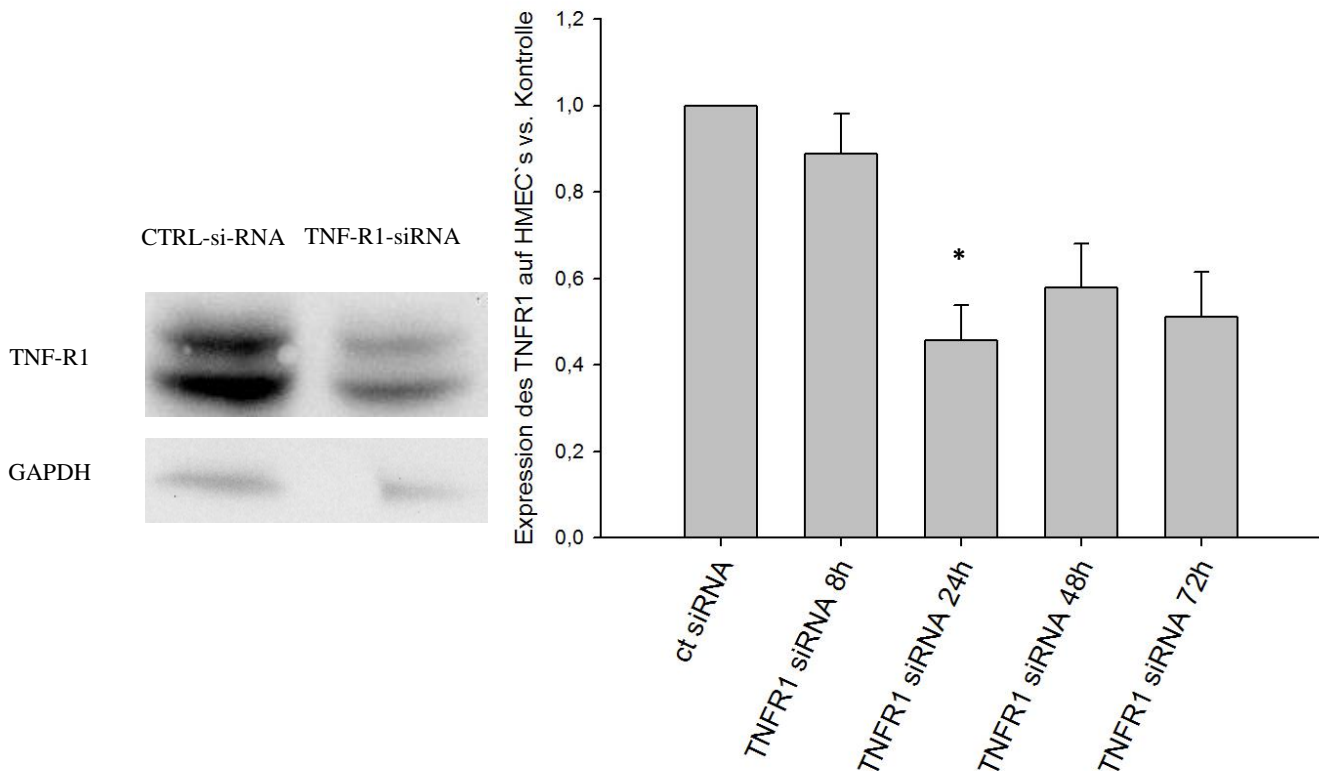


Abbildung 12: repräsentativer Western Blot mit Vergleich der typischen TNFR1-Doppelbände zwischen CTRL-transfizierten Zellen und mit TNFR1-si-RNA transfizierten Zellen. Darunter die jeweiligen GAPDH-Kontrollbänder

Abbildung 13: Darstellung der Minderexpression des TNFR1 nach Transfektion mit TNFR1-siRNA nach 8h, 24h, 28h und 72h. Es zeigt sich nach 24h bereits eine signifikante Reduktion der TNFR1-Expression im Vergleich zu CTRL-si-RNA transfizierten Zellen. **Es wurden HMEC-Zellen verwendet. , *P<0,05 vs. Ct siRNA (n=3)**

Untersucht wurde dies mittels Western Blotting mit spezifischen Antikörpern gegen TNFR1.

Es ergab sich eine deutliche Grundexpression mit starkem Bandenmuster in Ruhe und eine stark verminderte Bandierung nach 24 stündiger Transfektion mit TNFR1-si-RNA. Es wurde nach 8h, 24h und 72h gemessen und die Ergebnisse in Prozent des Ausgangsexpressionsmusters angegeben. Nach 24h ergab sich eine signifikante Reduktion auf 0,458% \pm 0,14 des Ausgangswertes. ($P=0,021$, $n=3$)

3.1. Sauerstoffradikale in HMEC`s

3.1.1. Sauerstoffradikale nach Hypoxie/Reperfusion

Um den destruktiven Effekt von Hypoxie/Reperfusion auf die Endothelfunktion zu validieren, wurde die Superoxidradikalbildung von HMEC`s unter Normoxie und H/R-Bedingungen untersucht, wobei die Hypoxiezeit eine Stunde betrug und danach eine Reoxygenierungsphase von einer Stunde folgte. Hierbei zeigte sich, dass CTRL-transfizierte Zellen im Vergleich zu ihrer Normoxie-Kontrollgruppe unter H/R Bedingungen mehr ROS produzierten. Bei den CTRL-transfizierten Zellen betrug die Produktion unter Normoxie im Mittelwert 0,0475U \pm 0,006 und bei H/R Bedingungen 0,0590U \pm 0,005. ($n=21$, $p<0,01$)

Nach siRNA-Transfektion betrug die ROS-Bildung nach H/R 0,0534U \pm 0,0075.

Um den Effekt vom TNFR1 gegenüber CTRL-Zellen zu untersuchen wurde die ROS-Bildung von diesen beiden Gruppen jeweils unter Normoxie bzw. H/R-Bedingungen gegeneinander verglichen.

Hierbei zeigte sich, dass TNFR1-KO Zellen gegenüber CTRL-transfizierten Zellen signifikant weniger ROS produzieren. ($n=21$, $p<0,01$)

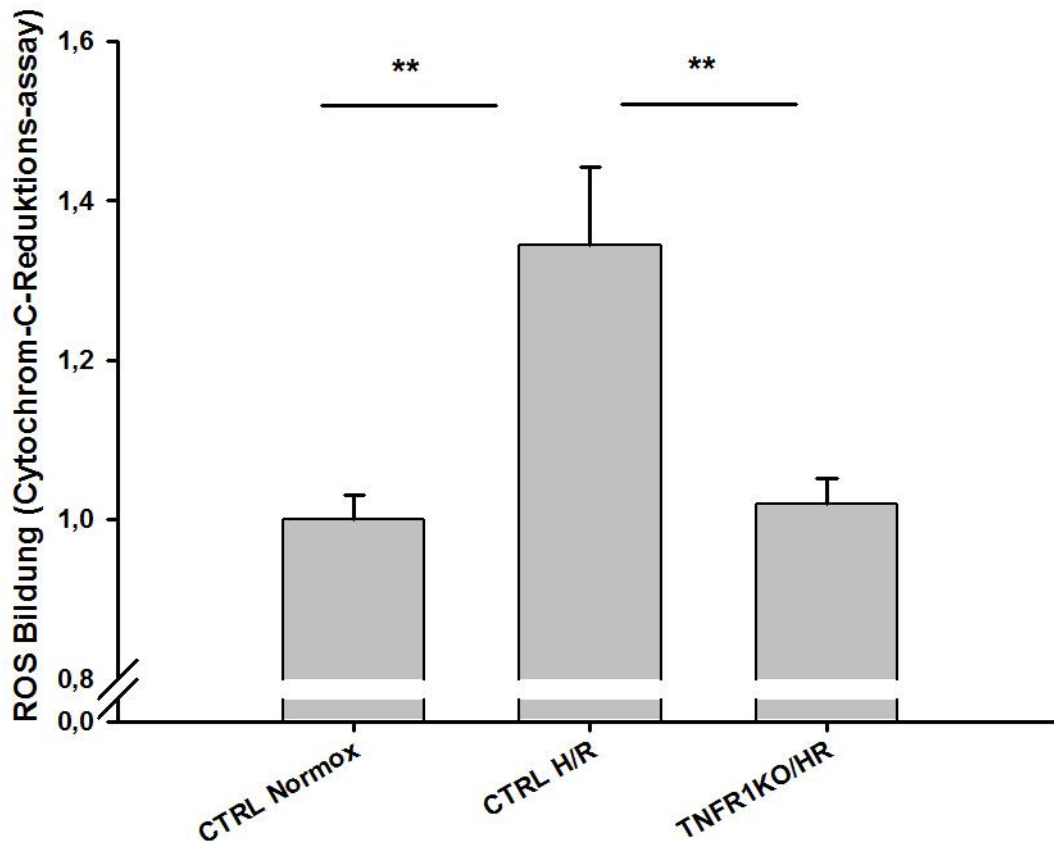


Abbildung 14: Bildung von ROS in HMEC's

Vergleich CTRL-transfizierter Zellen mit TNFR1-si-RNA-transfizierten Zellen nach H/R . Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der ROS-Bildung von CTRL-siRNA-Zellen nach H/R-Bedingungen im Vergleich zu unter Normoxie gehaltenen CTRL-SiRNA-transfizierten Zellen.

Weiterhin zeigt sich eine signifikante Verminderung der ROS-Bildung zwischen CTRL-behandelten Zellen und TNFR1-minderexprimierenden Zellen

** P<0,01; (n=21)

3.2. Präsenz der TNF α -Rezeptoren in Wildtyp und TNF α – Rezeptor - Knockout Mäusen in vivo

Vor Start der in vivo-Versuche wurde in den verwendeten TNF α -Rezeptor-Knockdown- Populationen stichprobenartig untersucht, ob die Zuchtpärchen wirklich das zu erwartende Expressionsmuster an TNF α -Rezeptoren zeigten. Hierzu wurden Neutrophile Granulozyten der Mäuse isoliert und deren Proteinsynthese mittels WesternBlot analysiert.

Diese Daten wurden in der Arbeitsgruppe gemeinsam erstellt.

Bezogen auf die Wildtyp-Population zeigte sich, wie erwartet war, in den TNF α -Rezeptor Knockout Populationen ein entsprechender Knockdown in den TNF α -Rezeptoren 1 bzw. 2.

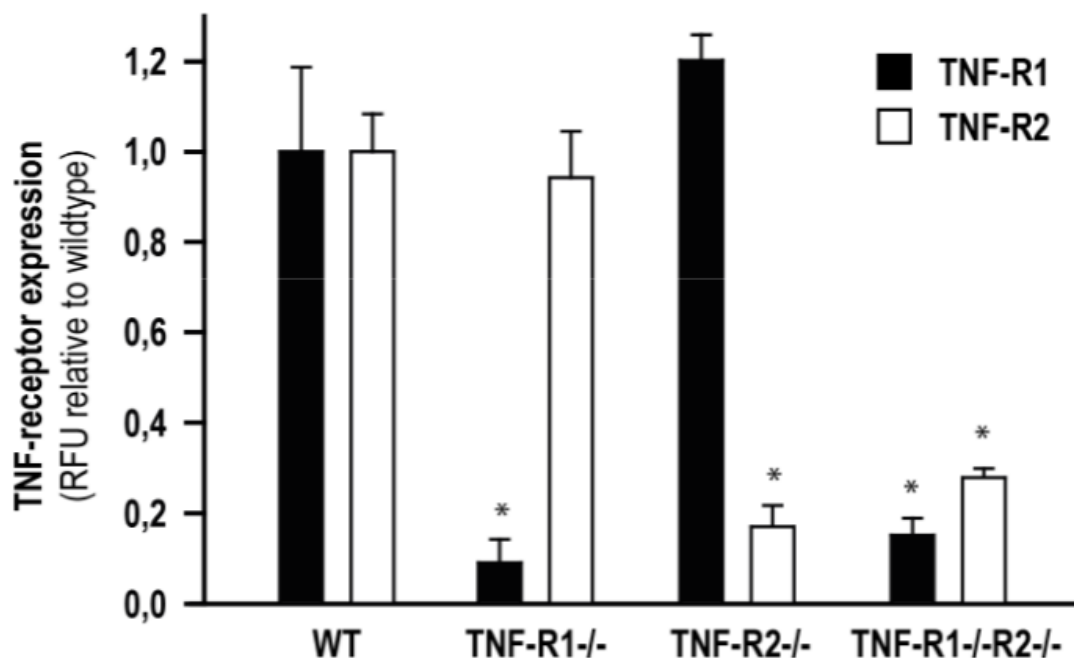


Abbildung 15: Expression der TNFR1 und TNFR2 auf Neutrophilen Granulozyten der jeweiligen Mausspezies

Die Analyse ergibt, dass TNF-R1 und TNF-R2 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten auf WT-Mäusen vorhanden sind. Auf TNFR-KO Mäusen war der entsprechende Rezeptor erfolgreich herunterreguliert * P<0.05 vs. WT (n=4)

[81] Pircher, Joachim; The TNF-receptor subtype 2 mediates prothrombotic effects in vivo; Dissertation; Universitätsbibliothek LMU München; 2011

3.3. Acetylcholin vermittelte Vasodilatation im intakten Endothel und nach I/R

Nachdem in der Zellkultur an HMEC's gezeigt werden konnte, dass bei Abwesenheit des TNFR1 weniger Radikale verglichen mit der Kontrollgruppe gebildet wurden, wurde nun überprüft, ob sich dieser Effekt auch auf die Vasomotorik bzw. die Endothelfunktion in vivo auswirkt.

Hierzu wurde zuerst die Endothelfunktion im nicht kompromittierten Endothel untersucht und im Folgenden als Kontrolle verwendet.

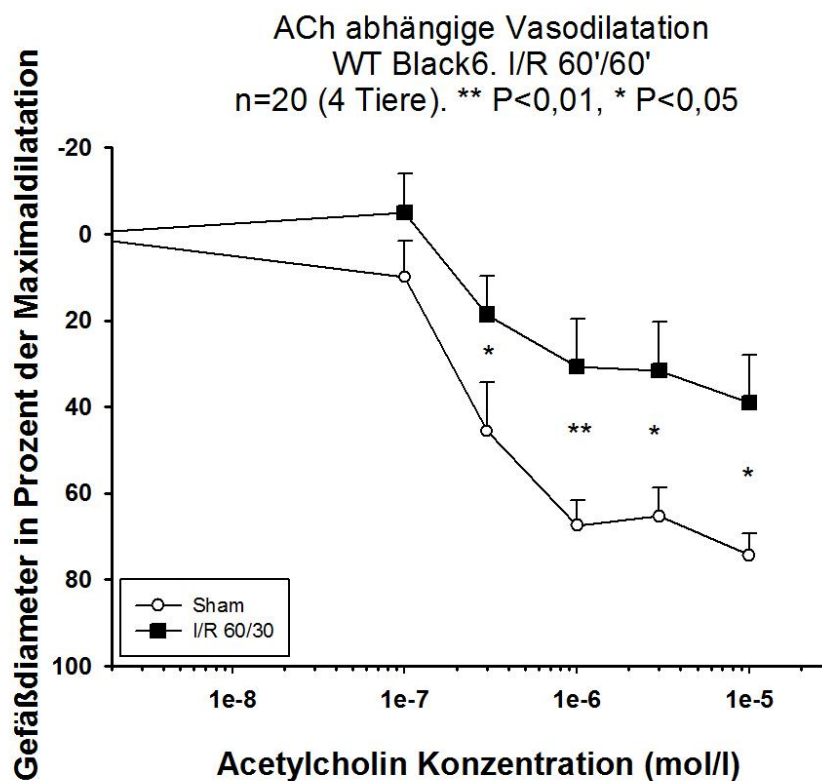


Abbildung 16: Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von Wildtyp-Mäusen vor und nach I/R

Es wurden Gefäßdiameter in Prozent ihrer maximalen Dilatation gemessen. In Normoxie-Bedingungen zeigt sich eine regelrechte Konzentrations-Dilatations-Kurve und somit eine regelrechte Endothelfunktion. Nach I/R von 60'/60' zeigt sich eine signifikante Verschlechterung der Dilatationskapazität und damit der Endothelfunktion.

** P<0,01, * P<0,05 (n=20 Gefäßabschnitte, 4 Tiere)

Hierbei zeigte sich eine Acetylcholin-konzentrationsabhängige Vasodilatation im Konzentrationsspektrum 10^{-07} bis 10^{-05} Mol ACh, welche einer regelrechten Endothelfunktion entspricht. Dies war gleichzeitig auch ein Beweis dafür, dass das Endothel durch die Präparation keinen signifikanten Schaden genommen hatte.

Um zu untersuchen, ob Ischämie/Reperfusion einen Einfluss auf die Endothelfunktion im Vergleich zum unbehandelten Endothel hat, wurde der Cremastermuskel für eine Stunde wie zuvor beschrieben ischämischen Bedingungen ausgesetzt und anschließend nach einer Stunde Reperfusion die endothelabhängige Vasodilatation mittels verschiedener Acetylcholin-Konzentrationen untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion gegenüber denselben Gefäßabschnitten vor der Schädigung. (s. Abb. 16)

3.4. Vasodilationskapazität in TNFR1-KO Mäusen

Um den Effekt des TNF α -Rezeptors1 nach Ischämie/Reperfusion auf die Endothelfunktion zu untersuchen, wurde der vorhergehende Versuch bei TNFR1-KO Mäusen entsprechend durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zum nicht geschädigten Endothel **keine** signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion nach Ischämie/Reperfusion (1h/1h). (n= 27)

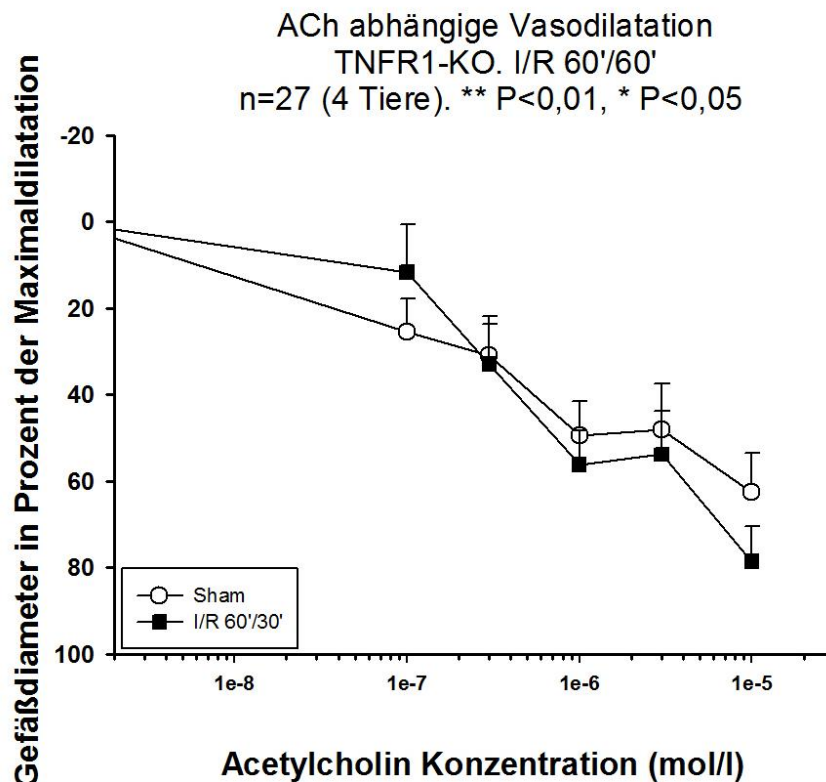


Abbildung 17: Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1-KO-Mäusen vor und nach I/R

Es wurden Gefäßdiameter in Prozent ihrer maximalen Dilatation gemessen. In Normoxie-Bedingungen zeigt sich eine regelrechte Konzentrations-Dilatations-Kurve und somit eine regelrechte Endothelfunktion. Nach I/R von 60'/60' zeigt sich **keine** signifikante Verschlechterung der Dilatationskapazität und damit der Endothelfunktion.

** P<0,01, * P<0,05 (n=27 Gefäßabschnitte, 4 Tiere)

Es zeigte sich sowohl vor als auch nach I/R-Schädigung eine regelrechte Acetylcholin-konzentrationsabhängige Vasodilatation im Konzentrationsspektrum 10^{-07} bis 10^{-05} Mol ACh.

3.5. Vasodilatation in TNFR2-KO Mäusen

In TNFA-Rezeptor2-Knockout Tieren mit intakten TNFR1 zeigte sich vor I/R-Schaden eine regelrechte Acetylcholin-konzentrationsabhängige Vasodilatation im Konzentrationsspektrum 10^{-07} bis 10^{-05} mMolACh.

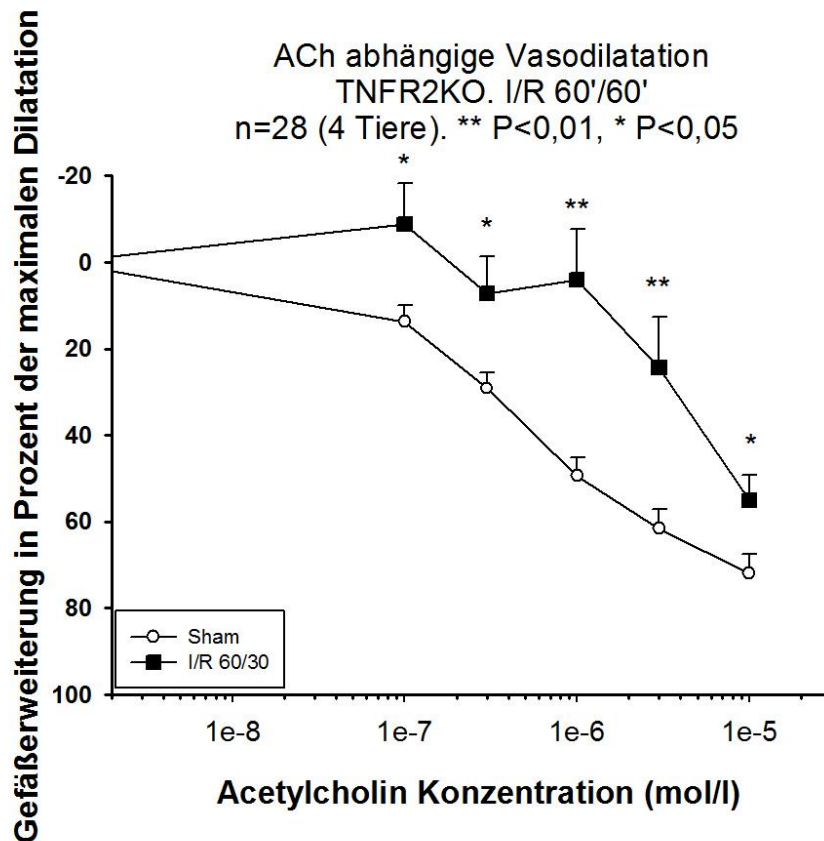


Abbildung 18 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR2-KO-Mäusen vor und nach I/R

Es wurden Gefäßdiameter in Prozent ihrer maximalen Dilatation gemessen. In Normoxie-Bedingungen zeigt sich eine regelrechte Konzentrations-Dilatations-Kurve und somit eine regelrechte Endothelfunktion. Nach I/R von 60'/60' zeigt sich eine signifikante Verschlechterung der Dilatationskapazität und damit der Endothelfunktion.

** P<0,01, * P<0,05 (n=28 Gefäßabschnitte, 4 Tiere)

Nach I/R-Schaden zeigte sich wie in den Wildtyp-tieren eine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion gegenüber denselben Gefäßabschnitten vor der Schadenssetzung.

3.6. Vasodilatation in TNFR1/2-KO Mäusen nach Ischämie/Reperfusion

In TNFR1/2-KO Tieren zeigte sich vor Schädigung ebenfalls eine regelrechte Acetylcholin-konzentrationsabhängige Vasodilatationskapazität im Konzentrationsspektrum 10^{-07} bis 10^{-05} Mol ACh.

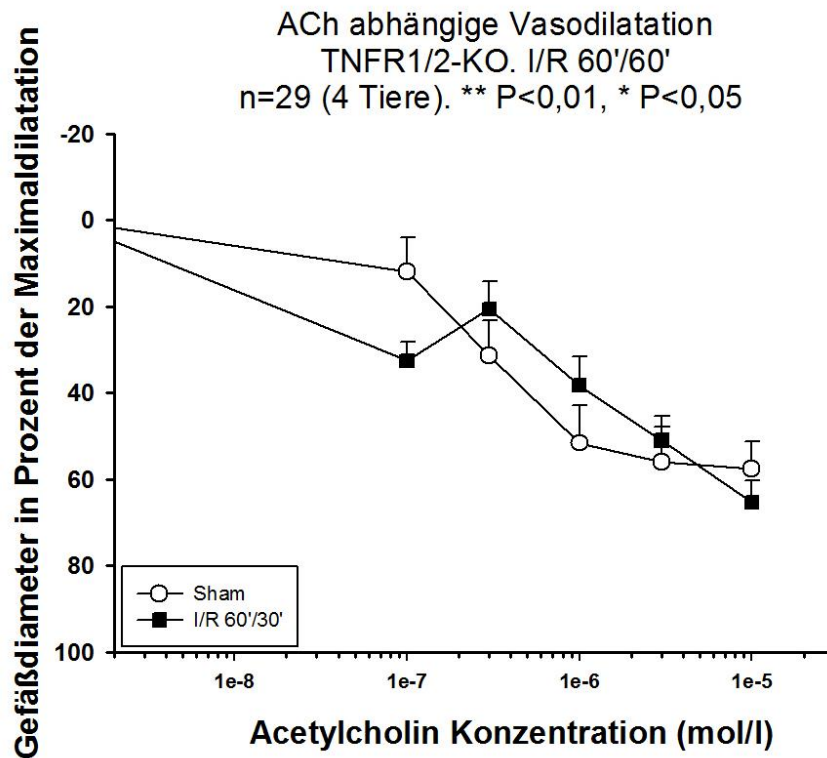


Abbildung 19 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1/2-KO-Mäusen vor und nach I/R

Es wurden Gefäßdiameter in Prozent ihrer maximalen Dilatation gemessen. In Normoxie-Bedingungen zeigt sich eine regelrechte Konzentrations-Dilatations-Kurve und somit eine regelrechte Endothelfunktion. Nach I/R von 60'/60' zeigt sich keine signifikante Verschlechterung der Dilatationskapazität und damit der Endothelfunktion.

** P<0,01, * P<0,05 (n=29 Gefäßabschnitte, 4 Tiere)

Nach I/R-Schädigung zeigte sich **keine** signifikante Änderung der endothelabhängigen Vasodilatation in den Konzentrationen von 10^{-07} bis 10^{-05} M Ach im Vergleich zu Kontrollbedingungen.

3.7. Vergleich der Vasodilatation von TNFR1-KO mit TNFR1/2-KO Mäusen nach Ischämie/Reperfusion

Um nun die Rolle des TNFR2 nach Ischämie/Reperfusion genauer zu beleuchten, wurde die endothelabhängige Dilatation von TNFR1-KO Mäusen mit denen von TNFR1/2-KO Mäusen verglichen.

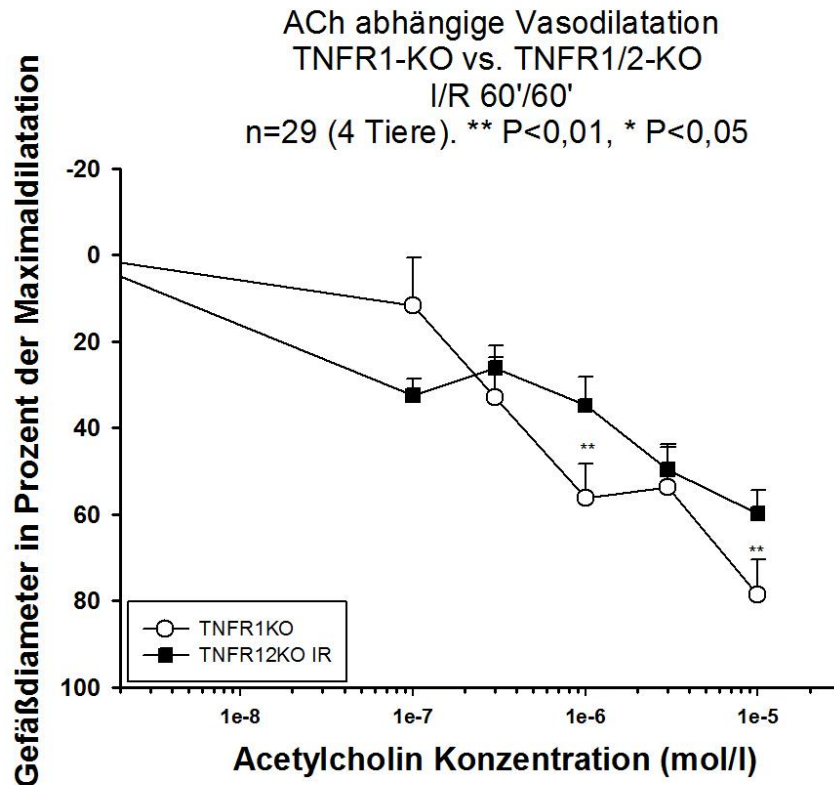


Abbildung 20 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1-KO-Mäusen und TNFR1/2-KO-Mäusen jeweils nach I/R

Es wurden Gefäßdiameter in Prozent ihrer maximalen Dilatation gemessen. Bei beiden Gruppen zeigt sich auch nach IR von 60'/60' eine konzentrationsabhängige Vasodilatation in Bezug auf Acetylcholin. In TNFR1-KO-Mäusen mit intakten TNFR2 zeigte sich in den Konzentrationen 10^{-06} und 10^{-05} mol/l eine signifikant bessere Endothelfunktion als in der Vergleichsgruppe ohne TNFR2.

** P<0,01, * P<0,05 (n=20 Gefäßabschnitte, 4 Tiere)

Es zeigte sich eine in beiden Entitäten weitgehend normale Endothelfunktion, mit der Tendenz (statistisch nicht signifikant) einer besseren Endothelfunktion der TNFR1-KO Mäuse bei höheren ACh- Konzentration mit ihrem intaktem TNFR2 gegenüber den TNFR1/2-KO-Tieren ohne TNFR2. So zeigte sich bei den Konzentrationen 10^{-06} und 10^{-05} Mol ACh ein signifikanter Unterschied.

4. Diskussion

Kardiovaskuläre Krankheiten sind in der heutigen Zeit eine der Hauptletalitätsursachen in der westlichen Zivilisation und gewinnen durch zunehmende Inzidenzen von Diabetes, Hypertonie und Hyperlipidämie stetig weiter an Bedeutung. Hierunter nehmen die ischämischen Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, die pAVK oder der Schlaganfall, (zu 80% ischämisch bedingt), die wichtigsten Plätze ein. Sie verursachen jährlich Milliarden an Kosten für das Gesundheitssystem. In letzter Zeit wurde man durch die Entdeckung, dass nicht nur der Ischämie- sondern auch der Reperfusionsschaden eine erhebliche Rolle spielt, immer mehr auf dieses Phänomen aufmerksam. Somit rückt die Erforschung einer Therapie durch Beseitigung der Ursache weiter in den Vordergrund.

Ein wichtiges Zytokin, welcher in der Entwicklung von kardiovaskulären Krankheiten von Bedeutung ist, ist TNF α .

Daher wurde diese Studie mit dem Ziel durchgeführt, den Einfluss von Ischämie/Reperfusion auf das Endothel und die Bedeutung des TNF α -Rezeptor-Systems genauer zu beleuchten.

4.1. Methodendiskussion

4.1.1. Cremaster-Modell der Maus

Wie bereits erläutert, wurde in dieser Studie das Cremaster-Modell der Maus verwendet. Dieses bietet einen direkten Einblick in die Mikrozirkulation und die Möglichkeit Manipulationen direkt und einfach auszuführen. Weiterhin ist es gut zu standardisieren, so dass ein Einfluss durch mangelnde Reproduzierbarkeit ausgeschlossen werden kann. Das Modell wurde und wird in der Wissenschaft für viele verschiedene Zwecke wie myoendotheliale Kopplung oder Vasomotorik verwendet. [82, 83] Ein Vorteil dessen ist, dass es durch die Darstellung eines ganzen Organes, des Musculus Cremaster, eine Bandbreite von Gefäßen und Diametern von weitulmigen Gefäßen bis hin zu Widerstandsgefäßen und Kapillaren abdeckt. Ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Modellen wie z.B. des Rückenhautkammer- Gefäßmodelles ist, dass bedingt durch die Dünne des Präparates die Bildqualität hervorragend ist und das Präparat nach Beendigung des Versuches einfach fixiert werden kann. Ein Nachteil des Modelles ist jedoch, dass die Maus in Narkose liegt und direkt

nach der Präparation verwendet wird, so dass Einflüsse durch Narkose oder operationsbedingte Reaktionen des Organismus Maus nicht ausgeschlossen werden können.

Ein Vorteil ist hier jedoch, dass Bewegungsartefakte und Verletzungen des Muskels durch plötzliche Zuckungen der Maus ausgeschlossen werden und ein sehr stabiles Modell für die Dauer des Versuches gegeben ist.

4.1.2. Ischämie/Reperfusion und Hypoxie/Reperfusion

Es gibt verschiedene Methoden zur Initialisierung von Ischämie und Reperfusion, darunter z.B. das Abklemmen der Iliacal- und Femoralarterien [84], die Infusion von nicht oxygenierter Flüssigkeit in den Cremastermuskel [85] oder das Abklemmen des Cremasterstumpfes mittels einer atraumatischen Klemme [86]. Es wurde sich für die Methodik mittels Klemmung des Cremasterstieles entschieden. Mittels Intravitalmikroskopie wurde die Stase innerhalb der Gefäße kontrolliert bzw. der Sitz der Klammer verändert, bis ein Sistieren des Flusses gegeben war um eventuelle Kollateralkreisläufe (verursacht durch einen unsachgemäßen Sitz der Klammer) auszuschließen.

Dieses Vorgehen wurde gewählt um das Trauma eines erweiterten Hautschnittes, welcher für die Manipulation an Iliacalgefäßen von Nöten gewesen wäre, zu minimieren, da jeder unnötige Eingriff eine Zytokinausschüttung von Entzündungszellen hervorruft und den Kreislauf des Tieres unnötig schwächt. Darüber hinaus liegt so eine möglichst genaue Abbildung der Pathophysiologie vor, welches einen Endarterienverschluss mit anschließender Wiedereröffnung derselben vorsieht. Dieses Modell wurde bereits in vielen verschiedenen Studien - auch mit dem Ziel einer Endothelschädigung hervorgerufen durch Radikale - erfolgreich verwendet. [87]

Auch bezüglich der Ischämie- und Reperfusionszeit gibt es in der Literatur unterschiedliche Gesichtspunkte. So variieren die Ischämiezeiten von wenigen Minuten [88, 89] bis hin zu mehreren Stunden [90]. Hierbei sind jedoch in der Literatur die niedrigen Ischämiezeiten bis hin zu 30 Minuten nur als Preconditioning ohne bleibende Schäden für das Gewebe verwendet worden, bevor der eigentliche Ischämieereiz gesetzt wird. Effektive Ischämiezeiten des Musculus Cremaster sind hauptsächlich zwischen 45 Minuten und 4h verwendet worden. In Studien, welche den Effekt auf das Endothel untersuchen, sind Ischämiezeiten von 4h und 2h die Norm.[87] In dieser Studie wurde sich für eine mittlere Ischämiezeit von 1h

entschieden, um möglichst nur das Endothel als ischämiesensibleres Organ zu schädigen und aufgrund der sensitiveren Antwort kleiner Gefäße wie Widerstandsgefäße auf I/R. [91] Außerdem wurde so die Liegezeit des Musculus Cremaster nicht unnötig in die Länge gezogen, um Kreislauffeffekte auszuschließen bzw. zu minimieren.

Ferner wurden bezüglich der Reperfusionszeit verschiedene Gründe erwogen. Bezüglich der Dauer der Reperfusionszeit gibt es in der Literatur erhebliche Unterschiede zwischen einigen Minuten bei Preconditioning bis hin zu mehreren Stunden. Es wurde sich für eine Zeit von einer Stunde entschieden, da die Effekte von TNF α -Rezeptoren untersucht werden sollten und bereits in Studien gezeigt wurde, dass direkt nach Beginn der Reperfusion TNF α -Level ansteigen und etwa bei einer Stunde ihren Höhepunkt haben. [92] Auch die Leukozytenaktivität, welche sich z.B. in Adhäsion oder Extravasation zeigt, gipfelt zu dieser Zeit oder ist bereits auf einem sehr hohem Level. [93]

4.1.3. Messung der endothelabhängigen Vasodilatationskapazität

Wie bereits im Methodenteil besprochen, wurde zur Messung der Endothelfunktion die Acetylcholinabhängige Vasodilatationskapazität als Parameter verwendet. Diese Methode wurde und wird von Mitarbeitern bzw. Ehemaligen der Arbeitsgruppe und des Institutes regelmäßig verwendet und ist die Standardmethode zur Evaluierung der Endothelfunktion bzw. der endothelialen Dysfunktion. [82, 83, 94-96] Als objektives Maß wurden die Gefäßdiameter in Bezug genommen auf die maximale Dilatation und als Dilatationskapazität mit Hilfe folgender Formel dargestellt:

$$\frac{(\text{Diameter gemessen} - \text{Diameter Ruhe}) \times 100}{\text{Diameter maximal} - \text{Diameter Ruhe}}$$

Gefäße, welche präinterventionell keine Reaktion auf Acetylcholin zeigten, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Weiterhin wurden nur Gefäße in die Auswertung miteinbezogen, wenn sie einen maximalen Durchmesser unter 50 μ m hatten, da arterioläre Widerstandsgefäße im Fokus der Untersuchung waren. In der Literatur herrschen Beschränkungen zwischen 35 μ m und 60 μ m vor. [96, 97] Es wurde sich in dieser Studie auf eine obere Grenze von 50 μ m geeinigt.

Um bei der Auswertung selbst einen Bias seitens des Untersuchers auszuschließen wurden die aufgenommenen Photos nach Ende des Versuches auf dem Computer dargestellt und in einer

zufälligen Reihenfolge ausgewertet. In diesem Stadium waren die Dateinamen lediglich Nummern und wurden erst nachträglich in das endgültige Dateiformat mit Bezeichnung der richtigen Konzentration etc. geändert. Zur zusätzlichen Sicherung wurde die Auswertung durch ein Mitglied der Arbeitsgruppe erneut ausgewertet, wobei sich am Ergebnis nichts änderte.

4.2. Sind auf Endothelzellen TNF α -Rezeptoren vorhanden?

Einleitend zu den Zellkulturversuchen ist zu erwähnen, dass ein struktureller Nachteil aller Zellkulturversuche darin liegt, dass wichtige Faktoren, welche in vivo vorliegen, wie Fluss, Turbulenzen oder Interaktionen mit anderen Zellen in vitro nicht vorliegen.

In dieser Studie wurde sich für die HMEC-Zelllinie entschieden. Es gibt verschiedene Endothel-Zelllinien wie beispielsweise HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), HDMEC`s (human dermal microvascular endothelial cells) oder HMEC`s. HDMEC`s haben den großen Nachteil, dass ihre Verfügbarkeit aufgrund schwieriger und zeitaufwendiger Isolation und Purifikation sehr gering ist. Außerdem sind es dermale Endothelzellen und haben somit andere Eigenschaften als muskuläre mikrovaskuläre Endothelzellen. [98] HUVEC`s werden aus der Umbilicalvene des Menschen gewonnen und stammen somit aus einem großlumigen Gefäß.

HMEC`s befinden sich meist in Passage 46-50, wenn sie in das Versuchsstadium eintreten. Ein großer Nachteil von HMEC`s besteht darin, dass sie mit unterschiedlichem Lebenszyklus Merkmale wie Adhäsionsmoleküle [98] verlieren können. Ein weiteres Manko beim Vergleich mit murinen Modellen ist, dass es sich um menschliche Zellen handelt und Interspezies-Unterschiede vorliegen können.

Ferner ist evident, dass es wichtige biologische und funktionelle Unterschiede zwischen Endothelzellen aus Gefäßen mit großen und kleinem Durchmesser gibt [99-102], wie unterschiedliches Wachstum und Regeneration [101, 103], die Sekretion von Prostaglandinen [100] und der Expression und Regulation Oberflächenproteinen [79, 104-106], wie auch die TNF α -Rezeptoren welche sind. Aus diesem Grunde wurden HMEC`s für die Darstellung von Effekten der Mikrozirkulation gewählt, da es sich um mikrovaskuläre Zellen handelt, sie in der Haltung Vorteile zu HDMEC`s bieten und es sich im Gegensatz zu HUVEC`s um Zellen aus kleineren Arterien handelt.[98]

Um die Rolle der TNF α -Rezeptoren in vitro und in vivo zu untersuchen, musste zuerst evaluiert werden, ob diese exprimiert werden und in ausreichendem Maße in vitro durch siRNA und in vivo mittels TNF α -Rezeptor-KO-Mäusen unterdrückbar sind.

In vitro wurde dies mittels Western Blotting verwirklicht. Hierbei zeigte sich auf HMEC's nativ ein deutliches Expressionsmuster des TNF α -Rezeptors 1. Dieses konnte nach Inkubation mit siRNA wie bereits im Methodenteil beschrieben nach 24h von 100% Ausgangsexpression auf 45,8% +/- 14 signifikant gesenkt werden. (P=0,021) In der Literatur wird eine Expression des TNF α -Rezeptor 1 und 2 auf Endothelzellen bestätigt und auch die Hemmung mittels siRNA ist evident. [107, 108]

In vivo wurde der Knockdown mittels TNF α -Rezeptor Knockout-Mäusen realisiert, von denen TNF α -Rezeptor 1, 2 und Rezeptor 1/2-Doppelknockout Mäuse zur Verfügung standen. Um das Expressionsmuster der Rezeptoren zu verifizieren, wurden regelmäßig Schwanzspitzen eingeschickt und dies bezüglich untersucht.

Hierbei zeigte sich in Bezug auf die Expression der Rezeptoren das erwartete Expressionsmuster. P<0,05, n=4.

Allerdings ist in der Literatur eine Hochregulation der TNF α -Rezeptoren in Gegenwart von TNF α beschrieben und auch die Expressionsmuster in verschiedenen Endothelzellen untereinander weichen stark voneinander ab. [108] Hierbei waren die Zellen jedoch über eine lange Zeit zwischen Zellpassagen mit TNF α inkubiert. In dieser Studie waren - bedingt durch die kurze Zeit des Experimentes - keine Änderungen auf Proteinebene zu erwarten.

4.3. Bildet das Endothel nach Hypoxie/Reoxygenierung in vitro Sauerstoffradikale und hat der TNF α -Rezeptor 1 Einfluss auf die Radikalproduktion?

4.3.1. Bedeutung von Sauerstoffradikalen

Sauerstoffradikale oder auch ROS können unterschiedlichster Herkunft sein, zum Beispiel sind viele Zelltypen wie Abwehrzellen in der Lage, mit Hilfe ihrer Enzymsysteme ROS zu bilden um feindliche Zellen zu schädigen oder Signalkaskaden in Gang zu setzen. Die Herkunft der Radikalbildung wird schon länger erforscht. So sind viele Enzymsysteme im Fokus der Aufmerksamkeit.

In phagozytischen Zellen sind dies hauptsächlich NADPH-Oxidasen. Aber es gibt auch Hinweise, dass in nicht-phagozytischen Zellen ROS zur Einleitung von Signalkaskaden gebildet werden. [109, 110] Es wurde schon früh von Zweier et al. vermutet, dass die Hauptquelle von ROS in Endothelzellen die Xanthinoxidase ist. [111] Durch Hemmung mit Allopurinol konnte er postischämisches Zellsterben vermindern. Von Baudry et al. konnte gezeigt werden, dass mittels Allopurinol postischämische ROS-Produktion vermindert werden konnte. [87]

In Zellkulturversuchen mit HUVEC's konnte gezeigt werden, dass nach milder Hypoxie sich die Quelle der endothelialen ROS-Produktion ändert: so tritt in der frühen Reoxygenierungsphase eine verstärkte Bildung von ROS durch die Xanthinoxidase auf, wohingegen die NADPH-Oxidase gehemmt wird. [112]

Weiterhin gelten ROS als eine der Hauptursachen für durch oxidativen Stress verursachte endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose. [113, 114] So tragen ROS dazu bei, dass die Bioverfügbarkeit von NO verringert wird, führen zu Apoptose, aktivieren Inflammation und Adhäsionsmoleküle oder vermindern das endotheliale Zellwachstum. [114] Darüber hinaus ist bekannt, dass ROS im Organismus verstärkt nach Ischämie/Reperfusion freigesetzt werden und stark zur Pathogenese des Ischämie-Reperfusions-Schadens beitragen. [87, 115-117] Demgemäß konnte bereits 1993 gezeigt werden, dass mit Radikalfängern die IR-Schäden verringert werden konnten und dass durch exogene Zufuhr radikalbildender Systeme wie Xanthinoxidase es gelungen war, gleichartige Schäden hervorzurufen. [118]

4.3.2. Einfluss von TNFR1 auf die Bildung von Sauerstoffradikalen

Die Rolle von TNF α nach I/R mit deren Schäden ist im Fokus der Forschung. Nach Injektion von anti-TNF α - Antikörper am ischämischen Mausmyokard zeigte sich eine starke Verringerung der Radikalproduktion. [1]

Es sollte hier gezeigt werden, welchen Einfluss der TNF α -Rezeptor-1 auf die Bildung von Sauerstoffradikalen nach I/R hat. Zuerst wurde dies in vitro untersucht, indem nach Ischämie/Reoxygenierung die Radikalbildung in Abhängigkeit vom TNFR1 gemessen wurde. Hierbei stellte sich einerseits heraus, dass nach I/R Endothelzellen signifikant mehr ROS produzierten als ihre mit Normoxie behandelten Kontrollzellen aber auch, dass nach der Hemmung des TNFR1 mittels siRNA die TNFR1-gehemmten Zellen signifikant weniger ROS bildeten als die mit CT-siRNA behandelten Zellen. Hieraus lässt sich ableiten, dass der TNFR1 eine wichtige Rolle in der Signalkaskade hat, welche nach Ischämie/Reperfusion zur Bildung von ROS führt.

Die Rolle des p55-Rezeptors (TNFR1) im Hinblick auf seine proarteriosklerotische Funktion ist bekannt. [119] Auch die Bedeutung von TNF α nach I/R im Hinblick auf endotheliale Dysfunktion wurde schon vermutet. [1] In dieser Studie wurde gezielt untersucht, welcher TNF α -Rezeptor für die endotheliale Dysfunktion nach I/R verantwortlich ist.

4.4. Welchen Einfluss hat Ischämie/Reperfusion auf die Endothelfunktion in vivo und welche Rolle hat TNF α auf diese?

Hierzu untersucht diese Arbeit in vivo wie bereits geschildert, die Wirkung von I/R auf die Endothelfunktion im murinen Cremaster-Modell hinsichtlich der Rolle der TNF α -Rezeptoren 1 und 2. Der Einfluss von Ischämie/Reperfusion auf verschiedene Organsysteme wurde bereits weitreichend erforscht.

Das primäre Ziel von I/R ist beispielsweise die Mikrozirkulation. [120-123] Hier führt sie zur endothelialen Dysfunktion mit der Unfähigkeit der Gefäße NO bereitzustellen. Weiterhin wurde bereits erforscht, dass die endotheliale Dysfunktion stark mit dem Auftreten von freien Radikalen einhergeht, welche zum einen während der Ischämie-Periode [87] und andererseits zum großen Teil mit dem erneuten Auftreten von Sauerstoff während der Reperfusion gebildet werden. Dies deutet darauf hin, dass ROS einen starken Einfluss auf die Entstehung

der Dysfunktion haben. [74, 124, 125] Dementsprechend kommt es bei langanhaltender Ischämie mit anschließender Reperfusion zu Vasokonstriktionen, verschlechterter kapillärer Durchblutung und endothelialer Dysfunktion. [120] Unsere Ergebnisse sind mit diesen konkordant – es konnte gezeigt werden, dass in Wildtyp-Mäusen nach einer I/R Phase die endotheliale Funktion gemessen an der acetylcholinabhängigen Vasodilatationskapazität signifikant sinkt. $P < 0,05$.

Um diesen Schaden zu reduzieren, welcher in der Medizin großen Einfluss hat, beispielsweise nach Extremitätentransplantation bzw. –replantationen, bei Kompartmentsyndromen oder bei Herzinfarkt und Schlaganfall, wurde schon vielen Therapieschemata nachgegangen. Zum Einen durch Hypothermie, welches durch eine Verringerung der Stoffwechselaktivität zur Verkleinerung der Sauerstoffschuld und Verringerung der „Abfallprodukte“ führt, zum Anderen über das ischämische Preconditioning (IPC), welches über eine Induktion einer Reihe von Proteinen zu einer erhöhten Ischämietoleranz des Organes führen kann. [126-128] Dieses wurde jedoch noch nicht am Menschen durchgeführt, und ist aus ethischen Gründen schwierig durchzuführen. Jedoch hat man in den Studien über Preconditioning festgestellt, dass nach IPC bei erneuter I/R- Belastung der negative Effekt auf die endotheliale Funktion geringer ist und darüber hinaus die TNF α Ausschüttung und NF- κ B Translokation geringer ist, so dass TNF α eine ursächliche Rolle bei der I/R induzierten Endothelschädigung zugesprochen werden konnte. [128] Ferner ist bekannt, dass TNF α eine große Rolle bei der Adhäsion von Entzündungszellen hat und diese eine wichtige Funktion bei I/R einnehmen. [1] In nachfolgenden Studien wurde durch Injektion von TNF α Antikörper gezeigt, dass dadurch die Radikalproduktion verringert und die Endothelfunktion signifikant gebessert werden konnte. [74] Gao et al. fanden heraus, dass in TNF α -defizienten Mäusen nach I/R keine Verringerung der acetylcholinabhängigen Endothelfunktion in isolierten Mäuseherzen auftrat. [75] In unseren Versuchen mit TNFR1/2 -/- -Mäusen konnten wir diese Ergebnisse von Rezeptorseite her bestätigen, da in diesen Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine signifikante Verringerung der Endothelfunktion eintrat. $P < 0,05$.

4.5. Rolle der TNF α -Rezeptoren

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, welcher Rezeptor für diesen Effekt des TNF α verantwortlich ist. Prinzipiell wirkt TNF α über zwei verschiedene Rezeptoren, den TNFR1/p55 und den TNFR2/p75. Diese Rezeptoren sind auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Ein Schwerpunkt der Forschung liegt auf der Erkundung der unterschiedlichen Wirkungen bzw. des Signalling dieser Rezeptoren. War lange Zeit der TNFR1 im Vordergrund der Forschung, so ist in letzter Zeit auch immer mehr der TNFR2 in den Fokus der Aufmerksamkeit gerutscht - begonnen dadurch, dass bei geringen TNF α Konzentrationen auch der p75-Rezeptor Funktionen des TNFR1 übernehmen bzw. unterstützen kann, und dass nach I/R bei fehlendem TNFR1 der p75-Rezeptor protektiv bzw. verkleinernd auf das geschädigte Areal bei Myokardinfarkt wirken kann. [119]

Verlässt man zunächst das Feld der I/R, merkt man, dass das TNF α -Signalling in verschiedenen Organsystemen nicht geradlinig ist. So wurde z.B. die Bedeutung des TNFR2 in der Entwicklung der Arteriosklerose erforscht und entdeckt, dass dieser deutliche proarteriosklerotische Ansätze zeigen kann. [129, 130] In Mausversuchen bezüglich Glomerulonephritis - die Hauptursache für Nierenversagen - wurde gezeigt, dass TNFR1-defiziente Mäuse nach Exposition mit immunkomplex-medierter Glomerulonephritis zuerst eine verminderte Immunantwort zeigten, dann jedoch die selben Symptome wie Wildtiere zeigen. TNFR2-defiziente Mäuse hingegen waren zu allen Zeitpunkten vor den negativen Folgen geschützt, wodurch die Schlussfolgerung nahe lag, dass der TNFR1 die systemische Immunantwort fördert aber der TNFR2 eine entscheidende Rolle bezüglich des komplementabhängigen Gewebeschadens spielt. [77] In Folgestudien wurde in Nierenglomeruli nach Exposition mit löslichem TNF α in vivo jedoch dem TNFR1 die Hauptrolle in der Aktivierung intrinsischer glomerulärer Zellen zugesprochen und dem TNFR2 lediglich eine Rolle bei niedrigen TNF α -Serumspiegeln und eine verstärkende Rolle bezüglich der über den TNFR1 mediierten Effekten. [131] Auf dem Gebiet der Nierentransplantation finden sich Hinweise darauf, dass der TNFR2 die frühe Organabstoßung begünstigt. [132]

Betrachtet man jedoch die den Knochenabbau begünstigenden Effekte von TNF α , zeigte sich in TNFR-KO-Studien, dass der TNFR2 protektiv auf den Knochenabbau der Maus wirkt. [133]

Anders stellt sich die Datenlage jedoch auf dem Feld der I/R dar. So ist hier bekannt, dass der p75-Rezeptor (TNFR2) positive Effekte im Sinne einer begünstigten postischämischen Neovaskularisierung hat. [134, 135] Auch bezüglich der Rolle des TNFR1 gibt es hier andere Ergebnisse:

Unsere Daten zeigen, dass bei TNFR1-defizienten Mäusen ähnlich wie bei den TNFR1/2-KO-Mäusen nach I/R kein signifikanter Endothelschaden auftritt ($p < 0,05$), wohingegen dieser bei TNFR2-defizienten Mäusen ähnlich wie bei Wildtyptieren entsteht. ($P < 0,05$) Dies ist in hohem Maße übereinstimmend mit Ergebnissen anderer Gruppen, insbesondere dass der p55-Rezeptor viele zelluläre Antworten einschließlich der Entzündungsreaktion vermittelt und auch für die Expression von Adhäsionsmolekülen von Leukozyten in Endothelzellen verantwortlich ist. [13, 20] Darüberhinaus ist bekannt, dass der TNFR1 über die Riboflavinkinase mit der NADPH-Oxidase gekoppelt ist, welche ein Hauptproduzent von ROS ist. [136] 2008 wurde von Flaherty festgestellt, dass in nicht IPC-vorbehandelten p55/-/-Mäusen verglichen mit Wildtypen nach I/R die Infarktgröße signifikant geringer war. [119] In einer weiteren Studie, welche das post-Myokardinfarkt-Überleben von Mäusen in Bezug auf die TNF α -Rezeptoren untersuchte, wurde bestätigt, dass das TNFR1-signalling schädlich für das Überleben verglichen mit der Wildtypgruppe ist, wohingegen der TNFR2 förderlich hierfür zu sein scheint. [137] In an Diabetes mellitus erkrankten Mäusen wurde entdeckt, dass die endotheliale Dysfunktion hauptsächlich eine TNF α induzierte Aktivierung der NADPH-Oxygenase und Xanthin-Oxydase ursächlich hat, und diese Wirkung durch eine Hochregulierung des TNFR1 vermittelt wird. [138]

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass von den beiden TNF α -Rezeptoren nach I/R der TNFR1 der Hauptverantwortliche für das Signalling ist, welches zur endothelialen Dysfunktion nach I/R in der Mikrozirkulation führt. Nach Ausschaltung des TNFR1 - entweder in TNFR1-KO oder in den TNFR1/2/-/- Mäusen - kommt es zu keiner signifikanten endothelialen Dysfunktion, wohingegen in den Wildtyp oder TNFR2/-/- Mäusen diese signifikant auftritt. Dies wird durch die bestehende Literatur in diesem Themenkreis bestätigt. Den als eher protektiv beschriebenen Effekt des TNFR2, konnten wir nur im Ansatz nachweisen. Nach Vergleich der Kurven der TNFR1/-/- und TNFR1/2/-/- Individuen war eine leicht verbesserte - allerdings nur in zwei Konzentrationen signifikante - Endothelfunktion in den Tieren auszumachen, bei denen der TNFR2 vorhanden und aktiv ist.

Insgesamt kann somit festgestellt werden, dass der TNFR1 für die endotheliale Dysfunktion nach I/R verantwortlich ist und der TNFR2 eine protektive Rolle in diesem Zusammenhang haben könnte.

4.6. Pathophysiologische und Klinische Konsequenzen

I/R spielt in unserem klinischen Alltag eine allgegenwärtige Rolle und ist mit ihren Folgen bei Erkrankungen wie Infarkten, Schlaganfällen, etc. einer der großen Kostenfaktoren unseres Gesundheitssystems. Hier spielt das Signalling über TNF α eine große Rolle.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der TNFR1 nach I/R hauptverantwortlich für die Schädigung der Endothelfunktion in der Skelettmuskulatur der Maus ist. Auch wenn die Rolle des TNF α und der Rezeptoren schon lange in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen gebracht wird, zeigt diese Arbeit unseres Wissens nach das erste Mal die Rolle der TNF α -Rezeptoren nach I/R bezüglich der endothelialen Dysfunktion. Es gibt gute Ansätze für den Mechanismus, denn nach der Ausschüttung von TNF α , welche I/R getriggert ist [92] kommt es nach Aktivierung vornehmlich des TNFR1 zu einer gesteigerten Tätigkeit von radikalproduzierenden Enzymsystemen wie der NADPH-Oxidase und der Xanthinoxidase. Daraus ergibt sich eine Gewebeschädigung des Endothels. Die Ergebnisse in unserer Arbeit führen zu der Vermutung, dass durch eine Blockierung des TNFR1 diese Schädigung reduziert werden kann. Der TNFR2 hat dagegen eher postischämisch protektive Funktion und führt so z.B. zu einer verbesserten Neovaskularisierung. [137]

Diese Entdeckungen belegen, warum rein mechanistisch Versuche einer Antizytokin-Therapie ein guter Weg für die Therapie vaskulärer Erkrankungen sein könnten. [76] Anti- TNF α -Pharmazeutika wie Infliximab oder Adalimumab haben bei Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis oder entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulzerosa zu guten Erfolgen geführt. [139-141] Auch bei Tierversuchen mit Infliximab nach intestinaler oder pulmonaler I/R führten diese zu einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion. Jedoch waren die Erfolge oft nur marginal [142] oder die Therapie führte aufgrund ihres breiten und unspezifischen Wirkspektrums mit Hemmung der auch positiven Effekte von TNF α zu vielen Nebenwirkungen und so zu Abbrüchen zahlreicher Studien. [143]

Auch zeigt sich, dass die TNF α -Rezeptoren bezüglich verschiedener Organsysteme (Endothel, Glomerulonephritis, Knochenabbau) mannigfaltige Wirkungen haben können, so

dass es nötig sein wird die Therapie pharmakokinetisch derart zu koppeln, dass Organsysteme gezielt angesteuert werden können.

Solche Rückschläge sollten nicht darüber hinwegtäuschen, dass man auf einem richtigen Weg ist und durch gezielte, molekulare Ansätze, wie die gezielte Ausschaltung von Rezeptorsubtypen mit einem Targeting auf spezifische Organsysteme, die schädliche Wirkung situationsabhängig bekämpfen und protektive Effekte breitenwirksamer Zytokine wie dem TNF α bewahren kann um so doppelt wirksam gegen die endotheliale Dysfunktion vorzugehen.

Selbst wenn die Kosten und Umstände der blockierenden Antikörper gegen TNF α ungünstige Voraussetzungen für eine tatsächliche Anwendung bei chronischen Erkrankungen wie der Arteriosklerose bedingen, so können aus unseren Ergebnissen doch wichtige Informationen über vaskuläre Effekte dieser heutzutage routinemäßig bei rheumatoiden Arthritis verwendeten Medikamente liefern.

5. Zusammenfassung

Gefäßerkrankungen sind in unserer Gesellschaft allgegenwärtig und verursachen neben enormen Kosten für das Gesundheitssystem eine stark verminderte Lebensqualität und erhöhte Morbidität bei den Erkrankten. Als Hauptursache für viele Gefäßerkrankungen - mit dem Endothel als vaskulärem Organ mit vielfältigen Funktionen - gilt die endotheliale Dysfunktion. Herzinfarkte, pAVK mit Organ- und Beinverlusten und Schlaganfälle gehören längst zum klinischen Alltag und stellen die Todesursache Nummer eins in der Gesundheitsstatistik dar - noch vor Krebserkrankungen. Pathophysiologisch geht diesen Erkrankungen in vielen Fällen eine Unfähigkeit des Endothels NO mittels der NO-Synthase zu produzieren und resultierend mit einer vermehrten ROS-Bildung voraus bzw. einher.

Es war bereits bekannt, dass I/R ein Faktor für nachhaltige Endothelschädigung ist und hierbei Mediatoren wie TNF α ausgeschüttet und die Bildung von ROS induziert wird. Es wurde allerdings noch nie untersucht, welche Rolle die verschiedenen TNF α -Rezeptoren bei Ischämie/Reperfusionsschaden (IRS) -bedingter TNF α -Ausschüttung besitzen, um auf diese Weise die molekularen Grundlagen der Endothelschädigung zu verstehen und so eventuell die Endothelschädigung minimieren zu können.

In dieser Arbeit wurde in vitro an HMEC`s mittels des Cytochrom-C-Reduktionsassays und Magneto-Transfektion mit TNFR1-siRNA die Bildung von ROS nach H/R gemessen. Hierbei zeigte sich durch H/R in CTRL-transfizierten Zellen eine vermehrte Bildung von ROS und durch die Hemmung der TNFR1-Exprimierung eine signifikante Verminderung der ROS-Produktion nach H/R.

Anschließend wurde das murine Cremaster-Modell in Wildtyp und TNF α -Rezeptor -1, -2, und Doppel-KO-Mäusen verwendet, um den Einfluss der TNF α -Rezeptoren nach I/R auf die Endothelfunktion zu untersuchen, welche als Acetylcholin-abhängige Vasodilatationskapazität gemessen wurde.

Hier zeigte sich in Wildtyp- und TNFR2-KO- Populationen eine signifikant reduzierte Endothelfunktion nach I/R. In den TNFR1- und TNFR1/2 defizienten Tieren zeigte sich keine signifikante Verschlechterung der Endothelfunktion nach I/R. Im Vergleich von TNFR1 und TNFR1/2-KO-Mäusen zeigte sich eine leicht verbesserte Endothelfunktion bei den Tieren mit intaktem TNFR2.

Somit lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass der TNFR1 die Bildung von ROS in vitro begünstigt und in vivo hauptverantwortlich für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion nach I/R (60'/60') ist, wohingegen bei dem TNFR2 eher eine protektive Rolle vermutet werden kann. Folglich konnte in dieser Studie die Rolle der TNF α -Rezeptoren nach I/R auf die Endotheldysfunktion nach I/R erstmals aufgezeigt werden.

Dementsprechend führen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis in der Rolle der TNF α -Rezeptoren, wobei für eine molekulare Rezeptor-gezielte Therapie sicherlich noch weitere Studien und Forschung nötig sind.

6. Appendix

6.1. Abkürzungsverzeichnis

• Ach	Acetylcholin
• ADP	Adenosindiphosphat
• APS	Ammoniumperoxydisulphat
• ATP	Adenosintriphosphat
• ACE	Angiotensin converting enzyme
• B16	Black-6
• BSA	bovines Serumalbumin
• CD	cluster of differentiation
• cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
• CTRL	Kontrolle
• DMEM	Dulbeccos Modifizierte Medien
• EDHF	Endothelium derived hyperpolarizing Factor
• EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
• eNOS	endotheliale NO-Synthase
• EZ bzw. EC	Endothelzelle bzw. -cell
• FADD	Fas-associated death domain
• GTP	Guanosin-Triphosphat
• HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cell
• HMEC	Human Microvascular Epithelial Cell
• H ₂ O	chemisch für Wasser
• H ₂ O ₂	chemisch für Wasserstoffperoxid
• H/R	Hypoxie/Reoxygenierung
• HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
• iNOS	induzierbare NO-Synthase
• ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
• ICD	Intracellulärdomäne
• IL	Interleukin
• IPC	Ischämisches Preconditioning
• I/R	Ischämie/Reperfusion
• IRS	Ischämie-Reperfusions-Schaden
• i.v.	intravenös
• IVC	Individuell-ventilierte Käfige
• JNK	c-JUN NH ₂ -terminalkinase
• KHK	Koronare Herzkrankheit
• KO	Knock-Out
• L-NMMA	L-NG-Monomethylarginine
• L-NNA	N-Omega-Nitro-L-Arginine

• MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
• mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
• NaCl	NatriumChlorid
• nNOS	neuronal NO-Synthase
• NO	nitrous-oxide, Stickoxid
• NOS	NO-Synthase
• ONOO-	Peroxynitrit
• OP	Operation
• P55-Rezeptor	TNF α -Rezeptor 1
• P75-Rezeptor	TNF α -Rezeptor 2
• pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
• PBS	Phosphate Buffered Saline
• RIP	receptor-interacting protein
• RNA	Ribonukleinsäure
• ROS	reactive oxygen species, reaktive Sauerstoffspezies
• SDS	sodium dodecyl sulfate
• siRNA	small interfering RNA
• SMC	smooth muscle cell
• SOD	Superoxiddismutase
• SODD	silencer of death domain
• TEMED	Tetramethylethylendiamin
• TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
• TNFR1	TNF α -Rezeptor-1
• TNFR2	TNF α -Rezeptor 2
• TNFR1/2-KO	TNF α -Rezeptor 1/2-Doppel-Knockout
• TRADD	TNF α receptor-associated death domain
• TRAF2	TNF α -receptor associated factor 2

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:TNF α -Signalling	6
Abbildung 2: Interaktion von Endothelzellen (EZ) mit glatten Muskelzellen (GMZ); Aktivierung der NO-Synthase (NOS) und konsekutive Bildung von NO (nitrous oxide) aus L-Arginin mit nachgeschalteter Relaxation der glatten Muskelzelle auf NO;	9
Abbildung 3: Bildung von NO;	10
Abbildung 4: Wirkungen von NO auf das Kardiovaskuläre System.....	11
Abbildung 5: Rolle von TNFalpha bei der Entstehung endothelialer Dysfunktion.....	13
Abbildung 6: Aufbau des Präparierarbeitsplatzes mit OP-Mikroskop, OP-Tisch und mikrochirurgischen Instrumenten.....	18
Abbildung 7: Lagerung der narkotisierten Maus auf der Wärmeplatte vor Anlage des Jugularis-Katheters und anschließender Präparation des Musculus cremaster	19
Abbildung 8: Nach Inzision des Skrotums wird der Cremaster-Muskel vorsichtig unter Abpräparation von Bindegewebe freigelegt und inzidiert.	20
Abbildung 9: Darstellung des Musculus Cremaster nach Fixierung mittels Fäden oder hier Metall-Pins am außen liegendem Silikonstreifen. Es ist die Aufzweigung der Hauptarterie mit Begleitvenen in ihre Generationen deutlich zu erkennen.....	21
Abbildung 10: In-vivo-Mikroskopie-Arbeitsplatz mit angeschlossenem Kamera- und Computersystem. Hier liegt gerade eine Maus mit Rückenhautkammermodell auf	23
Abbildung 11 Bild des Musculus Cremaster unter dem In-Vivo-Mikroskop	24
Abbildung 12: repräsentativer Western Blot mit Vergleich der typischen TNFR1-Doppelbande zwischen CTRL-transfizierten Zellen und mit TNFR1-si-RNA transfizierten Zellen. Darunter die jeweiligen GAPDH-Kontrollbanden	35
Abbildung 13: Darstellung der Mindereexpression des TNFR1 nach Transfektion mit TNFR1-siRNA nach 8h, 24h, 28h und 72h.	35
Abbildung 14: Bildung von ROS in HMEC's	37
Abbildung 15: Expression der TNFR1 und TNFR2 auf Neutrophilen Granulozyten der jeweiligen Mausspezies	38
Abbildung 16: Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von Wildtyp-Mäusen vor und nach I/R.....	39
Abbildung 17: Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1-KO-Mäusen vor und nach I/R	41
Abbildung 18 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR2-KO-Mäusen vor und nach I/R	42
Abbildung 19 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1/2-KO-Mäusen vor und nach I/R.....	43
Abbildung 20 Acetylcholin-abhängige Vasodilatation von TNFR1-KO-Mäusen und TNFR1/2-KO-Mäusen jeweils nach I/R.....	44

6.3. Danksagung

Ich danke ganz besonders meinem Doktorvater **Prof. Dr. med. F. Krötz** für die hervorragende fachliche Anleitung und überaus wertvollen Diskussionen. So wurde meine Ausbildung sowohl durch seine fachliche Beratung, als auch persönliche Betreuung in entscheidender Weise geprägt.

Ich danke Herrn **PD Dr. med. Volker Vielhauer** vielmals für die Bereitstellung der TNF α -Rezeptor-KO-Mäuse.

Im Besonderen bedanke ich mich bei **Dr. Hanna Mannell**, welche mich stets unterstützt hat und im Bereich der Zellkultur stets ein offenes Ohr für Probleme und Diskussionen hatte und bei **Dr. Joachim Pircher**, welcher mir die feinpräparatorischen Methoden näher gebracht hat.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich auch bei den anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für kardiovaskuläre Physiologie der LMU München, **Elisabeth Koch, Ariane Hammitzsch, Lena Struthmann, Stefan Alig, Franziska Fochler** und **Ramona Mettler**, die ich im Laufe der Zeit sowohl fachlich als auch menschlich zu schätzen gelernt habe, für ihre stete Hilfsbereitschaft und ihre Gesellschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen danke ich **meinen Eltern** und meinem **Bruder**, die mir das Studium und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben und darüber hinaus auch in jeder Hinsicht während der gesamten Arbeit mit viel Verständnis eine unendlich große Stütze und Rückhalt für mich waren und somit auch einen wesentlichen Anteil an dem Entstehen dieser Arbeit haben.

6.4. Literaturverzeichnis

1. Gao, X., et al., *Role of TNF-alpha-induced reactive oxygen species in endothelial dysfunction during reperfusion injury*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **295**(6): p. H2242-9.
2. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
3. Wallach, D., et al., *Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor*. Agents Actions Suppl, 1991. **35**: p. 51-7.
4. Santee, S.M. and L.B. Owen-Schaub, *Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21151-9.
5. Aggarwal, B.B., T.E. Eessalu, and P.E. Hass, *Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon*. Nature, 1985. **318**(6047): p. 665-7.
6. Holtmann, M.H. and M.F. Neurath, *Differential TNF-signaling in chronic inflammatory disorders*. Curr Mol Med, 2004. **4**(4): p. 439-44.
7. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
8. Engelmann, H., et al., *Antibodies to a soluble form of a tumor necrosis factor (TNF) receptor have TNF-like activity*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14497-504.
9. Thoma, B., et al., *Identification of a 60-kD tumor necrosis factor (TNF) receptor as the major signal transducing component in TNF responses*. J Exp Med, 1990. **172**(4): p. 1019-23.
10. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.
11. Gupta, S., *A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling*. J Clin Immunol, 2002. **22**(4): p. 185-94.
12. Gupta, S., *Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules*. Exp Gerontol, 2002. **37**(2-3): p. 293-9.
13. Vandenabeele, P., et al., *Two tumour necrosis factor receptors: structure and function*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(10): p. 392-9.
14. MacEwan, D.J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal, 2002. **14**(6): p. 477-92.
15. Shinoda, S., et al., *Formation of a tumour necrosis factor receptor 1 molecular scaffolding complex and activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 during seizure-induced neuronal death*. Eur J Neurosci, 2003. **17**(10): p. 2065-76.
16. Kondo, S. and D.N. Sauder, *Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation*. Eur J Immunol, 1997. **27**(7): p. 1713-8.
17. Deckert-Schluter, M., et al., *Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3427-36.
18. Ferrero, E., et al., *Roles of tumor necrosis factor p55 and p75 receptors in TNF-alpha-induced vascular permeability*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **281**(4): p. C1173-9.
19. Pober, J.S., et al., *Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species*. J Immunol, 1987. **138**(10): p. 3319-24.
20. Slowik, M.R., et al., *Tumor necrosis factor activates human endothelial cells through the p55 tumor necrosis factor receptor but the p75 receptor contributes to activation at low tumor necrosis factor concentration*. Am J Pathol, 1993. **143**(6): p. 1724-30.
21. Jirik, F.R., et al., *Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells*. J Immunol, 1989. **142**(1): p. 144-7.
22. Nawroth, P.P., et al., *Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1363-75.
23. Nawroth, P., et al., *Tumor necrosis factor/cachectin-induced intravascular fibrin formation in meth A fibrosarcomas*. J Exp Med, 1988. **168**(2): p. 637-47.
24. Nawroth, P.P. and D.M. Stern, *Modulation of endothelial cell hemostatic properties by tumor necrosis factor*. J Exp Med, 1986. **163**(3): p. 740-5.

25. Estrada, C., et al., *Nitric oxide mediates tumor necrosis factor-alpha cytotoxicity in endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **186**(1): p. 475-82.
26. Yoshizumi, M., et al., *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life*. Circ Res, 1993. **73**(1): p. 205-9.
27. Santoro, D., et al., *Endothelial dysfunction in chronic renal failure*. J Ren Nutr, 2010. **20**(5 Suppl): p. S103-8.
28. Busse, R., et al., *EDHF: bringing the concepts together*. Trends Pharmacol Sci, 2002. **23**(8): p. 374-80.
29. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
30. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
31. Corpas, F.J., L.A. Del Rio, and J.B. Barroso, *Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: Nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways?* Plant Signal Behav, 2008. **3**(5): p. 301-3.
32. Rubanyi, G.M., *The discovery of endothelin: The power of bioassay and the role of serendipity in the discovery of endothelium-derived vasocative substances*. Pharmacol Res, 2010. **63**(6): p. 448-54.
33. Fleming, I. and R. Busse, *NO: the primary EDRF*. J Mol Cell Cardiol, 1999. **31**(1): p. 5-14.
34. Palmer, R.M., D.S. Ashton, and S. Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988. **333**(6174): p. 664-6.
35. Palmer, R.M. and S. Moncada, *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **158**(1): p. 348-52.
36. Moncada, S., *The L-arginine: nitric oxide pathway, cellular transduction and immunological roles*. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res, 1993. **28**: p. 97-9.
37. Huang, P.L., et al., *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995. **377**(6546): p. 239-42.
38. Vallance, P., J. Collier, and S. Moncada, *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man*. Lancet, 1989. **2**(8670): p. 997-1000.
39. Loscalzo, J., *Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis*. Circ Res, 2001. **88**(8): p. 756-62.
40. Thom, S.A., et al., *The release of the endothelium derived relaxing factor from isolated human arteries*. J Hypertens Suppl, 1985. **3**(3): p. S97-9.
41. Ludmer, P.L., et al., *Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1986. **315**(17): p. 1046-51.
42. Vergnani, L., et al., *Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability*. Circulation, 2000. **101**(11): p. 1261-6.
43. Wolin, M.S., S.A. Gupte, and R.A. Oeckler, *Superoxide in the vascular system*. J Vasc Res, 2002. **39**(3): p. 191-207.
44. Wolin, M.S., *Interactions of oxidants with vascular signaling systems*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(6): p. 1430-42.
45. Cai, H. and D.G. Harrison, *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
46. Drexler, H., *Endothelial dysfunction: clinical implications*. Prog Cardiovasc Dis, 1997. **39**(4): p. 287-324.
47. Haller, H., *Endothelial function. General considerations*. Drugs, 1997. **53 Suppl 1**: p. 1-10.
48. Versari, D., L.O. Lerman, and A. Lerman, *The importance of reendothelialization after arterial injury*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(17): p. 1811-24.
49. Wang, B.Y., et al., *Dietary arginine prevents atherogenesis in the coronary artery of the hypercholesterolemic rabbit*. J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(2): p. 452-8.
50. Aji, W., et al., *L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice*. Circulation, 1997. **95**(2): p. 430-7.
51. Boger, R.H., et al., *Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin*. Circulation, 1997. **96**(4): p. 1282-90.

52. Zhang, H., et al., *Role of TNF-alpha in vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(3): p. 219-30.
53. MacNaul, K.L. and N.I. Hutchinson, *Differential expression of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions*. Biochem Biophys Res Commun, 1993. **196**(3): p. 1330-4.
54. Seidel, M., H. Billert, and M. Kurpisch, *Regulation of eNOS expression in HCAEC cell line treated with opioids and proinflammatory cytokines*. Kardiologia Pol, 2006. **64**(2): p. 153-8; discussion 159-60.
55. Xia, Z., et al., *N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha-induced human vascular endothelial cell apoptosis and restores eNOS expression*. Eur J Pharmacol, 2006. **550**(1-3): p. 134-42.
56. Goodwin, B.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **293**(2): p. H1115-21.
57. Zhang, J., et al., *Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1997. **96**(1): p. 71-87.
58. Gao, X., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice*. Circulation, 2007. **115**(2): p. 245-54.
59. Aoki, N., M. Siegfried, and A.M. Lefer, *Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries*. Am J Physiol, 1989. **256**(5 Pt 2): p. H1509-12.
60. Ahmad, M., et al., *Role of isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase in tumor necrosis factor-alpha stimulation of expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(5): p. 759-64.
61. Picchi, A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome*. Circ Res, 2006. **99**(1): p. 69-77.
62. Kerrigan, C.L. and M.A. Stotland, *Ischemia reperfusion injury: a review*. Microsurgery, 1993. **14**(3): p. 165-75.
63. Leaf, A., *Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury*. Circulation, 1973. **48**(3): p. 455-8.
64. Schmid-Schonbein, G.W., *Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation*. Fed Proc, 1987. **46**(7): p. 2397-401.
65. Menger, M.D., D. Steiner, and K. Messmer, *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1892-900.
66. Menger, M.D., et al., *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox"*. Am J Physiol, 1992. **263**(6 Pt 2): p. H1901-6.
67. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 159-63.
68. Jaeschke, H., *Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury*. Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **209**(2): p. 104-11.
69. Jaeschke, H., *Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases*. Am J Physiol, 1997. **273**(3 Pt 1): p. G602-11.
70. Nagel, E., et al., *Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury*. Int J Vitam Nutr Res, 1997. **67**(5): p. 298-306.
71. Kunz, R., et al., *[Ischemia/reperfusion damage of the liver caused by free radicals--direct radical detection using electron spin resonance (ESR)]*. Langenbecks Arch Chir, 1991. **376**(3): p. 139-42.
72. Nunes, F.A., et al., *Chemiluminescent measurement of increased free radical formation after ischemia/reperfusion. Mechanisms of free radical formation in the liver*. Dig Dis Sci, 1995. **40**(5): p. 1045-53.
73. Suyavaran, A., et al., *TNF-alpha suppression by glutathione preconditioning attenuates hepatic ischemia reperfusion injury in young and aged rats*. Inflamm Res, 2015. **64**(1): p. 71-81.
74. Zhang, C., et al., *TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(3): p. 475-80.
75. Gao, X., et al., *TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(6): p. 1269-75.

76. Pei, H., et al., *TNF-alpha inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress*. Free Radic Biol Med, 2015. **82**: p. 114-21.
77. Vielhauer, V., G. Stavrakis, and T.N. Mayadas, *Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1199-209.
78. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. Microvasc Res, 1973. **5**(3): p. 384-94.
79. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(6): p. 683-90.
80. Alig, S.K., et al., *The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) protein levels in endothelial cells under hypoxia*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121113.
81. Picher, Joachim; *The TNF-receptor subtype 2 mediates prothrombotic effects in vivo*; Dissertation; Universitätsbibliothek LMU München; 2011
82. Siegl, D., et al., *Myoendothelial coupling is not prominent in arterioles within the mouse cremaster microcirculation in vivo*. Circ Res, 2005. **97**(8): p. 781-8.
83. Howitt, L., et al., *Dietary obesity increases NO and inhibits BKCa-mediated, endothelium-dependent dilation in rat cremaster muscle artery: association with caveolins and caveolae*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. **302**(12): p. H2464-76.
84. Krokowicz, L., et al., *Pulsed acoustic cellular expression as a protective therapy against I/R injury in a cremaster muscle flap model*. Microvasc Res, 2012. **83**(2): p. 213-22.
85. Wang, W.Z., et al., *Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury*. Plast Reconstr Surg, 1997. **99**(4): p. 1099-108.
86. Banbury, J., et al., *Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor*. Plast Reconstr Surg, 2000. **106**(7): p. 1541-6.
87. Baudry, N., E. Laemmel, and E. Vicaut, *In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(2): p. H821-8.
88. Kuntscher, M.V., et al., *Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model*. Microsurgery, 2002. **22**(6): p. 221-6.
89. Wang, W.Z., et al., *Initiation of microvascular protection by nitric oxide in late preconditioning*. J Reconstr Microsurg, 2000. **16**(8): p. 621-8.
90. Huang, S.S., F.C. Wei, and L.M. Hung, *Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte--endothelial cell interactions: role of nitric oxide and protein kinase C*. Circ J, 2006. **70**(8): p. 1070-5.
91. Szocs, K., *Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance*. Gen Physiol Biophys, 2004. **23**(3): p. 265-95.
92. Takenaka, H., et al., *Microvascular transport is associated with TNF plasma levels and protein synthesis in postischemic muscle*. Am J Physiol, 1998. **274**(6 Pt 2): p. H1914-9.
93. Scheiermann, C., et al., *Junctional adhesion molecule-C mediates leukocyte infiltration in response to ischemia reperfusion injury*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(10): p. 1509-15.
94. Koeppen, M., et al., *cGMP-dependent protein kinase mediates NO- but not acetylcholine-induced dilations in resistance vessels in vivo*. Hypertension, 2004. **44**(6): p. 952-5.
95. Potocnik, S.J., et al., *Endothelium-dependent vasodilation in myogenically active mouse skeletal muscle arterioles: role of EDH and K(+) channels*. Microcirculation, 2009. **16**(5): p. 377-90; 1 p following 390.
96. Wolfle, S.E., et al., *Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation in vivo*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 476-83.
97. Wolfle, S.E., et al., *Connexin45 cannot replace the function of connexin40 in conducting endothelium-dependent dilations along arterioles*. Circ Res, 2007. **101**(12): p. 1292-9.
98. Xu, Y., et al., *Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1)*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(6): p. 833-7.

99. Kubota, Y., et al., *Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures*. J Cell Biol, 1988. **107**(4): p. 1589-98.
100. Charo, I.F., et al., *Prostaglandin I₂ is not a major metabolite of arachidonic acid in cultured endothelial cells from human foreskin microvessels*. J Clin Invest, 1984. **74**(3): p. 914-9.
101. Folkman, J., C.C. Haudenschild, and B.R. Zetter, *Long-term culture of capillary endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5217-21.
102. Gerritsen, M.E., *Functional heterogeneity of vascular endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(17): p. 2701-11.
103. Davison, P.M., K. Bensch, and M.A. Karasek, *Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture*. J Invest Dermatol, 1980. **75**(4): p. 316-21.
104. Fujimoto, T. and S.J. Singer, *Immunocytochemical studies of endothelial cells in vivo. II. Chicken aortic and capillary endothelial cells exhibit different cell surface distributions of the integrin complex*. J Histochem Cytochem, 1988. **36**(10): p. 1309-17.
105. Swerlick, R.A., et al., *Studies of the modulation of MHC antigen and cell adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(2): p. 190-6.
106. Swerlick, R.A., et al., *Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells*. J Immunol, 1992. **149**(2): p. 698-705.
107. Perrot-Appianat, M., et al., *Similar NF-kappaB gene signatures in TNF-alpha treated human endothelial cells and breast tumor biopsies*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21589.
108. Viemann, D., et al., *TNF induces distinct gene expression programs in microvascular and macrovascular human endothelial cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(1): p. 174-85.
109. Ushio-Fukai, M., *Localizing NADPH oxidase-derived ROS*. Sci STKE, 2006. **2006**(349): p. re8.
110. Cheng, G., et al., *Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5*. Gene, 2001. **269**(1-2): p. 131-40.
111. Zweier, J.L., P. Kuppusamy, and G.A. Lutty, *Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(11): p. 4046-50.
112. Sohn, H.Y., et al., *Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine*. Cardiovasc Res, 2003. **58**(3): p. 638-46.
113. Aoki, C., et al., *Miglitol, an Anti-diabetic Drug, Inhibits Oxidative Stress-Induced Apoptosis and Mitochondrial ROS Over-Production in Endothelial Cells by Enhancement of AMP-Activated Protein Kinase*. J Pharmacol Sci, 2012. **120**(2): p. 121-8.
114. Yung, L.M., et al., *Reactive oxygen species in vascular wall*. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2006. **6**(1): p. 1-19.
115. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
116. Pangare, M. and A. Makino, *Mitochondrial function in vascular endothelial cell in diabetes*. J Smooth Muscle Res, 2012. **48**(1): p. 1-26.
117. Struthmann, L., et al., *Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo*. J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1727-35.
118. Prasad, K., J. Kalra, and L. Bharadwaj, *Cardiac depressant effects of oxygen free radicals*. Angiology, 1993. **44**(4): p. 257-70.
119. Flaherty, M.P., et al., *The role of TNF-alpha receptors p55 and p75 in acute myocardial ischemia/reperfusion injury and late preconditioning*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(6): p. 735-41.
120. Wang, W.Z., et al., *Acute microvascular action of vascular endothelial growth factor in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury*. Plast Reconstr Surg, 2005. **115**(5): p. 1355-65.
121. Gavin, J. and S. Haunso, *Introduction to the Focused Issue: The Microcirculation as a Foundation of Cardiovascular Disease*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(12): p. 2529-2530.
122. DeFily, D.V., *Control of microvascular resistance in physiological conditions and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(12): p. 2547-54.

123. Frangogiannis, N.G., et al., *Cytokines and the microcirculation in ischemia and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(12): p. 2567-76.
124. Downey, J.M., et al., *Superoxide dismutase therapy for myocardial ischemia*. Free Radic Res Commun, 1991. **12-13 Pt 2**: p. 703-20.
125. Salvemini, D. and S. Cuzzocrea, *Superoxide, superoxide dismutase and ischemic injury*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. **3**(6): p. 886-95.
126. Wang, W.Z., et al., *Ischemic preconditioning versus intermittent reperfusion to improve blood flow to a vascular isolated skeletal muscle flap of rats*. J Trauma, 1998. **45**(5): p. 953-9.
127. Adanali, G., K. Ozer, and M. Siemionow, *Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps*. Plast Reconstr Surg, 2002. **109**(4): p. 1344-51.
128. Hung, L.M., et al., *Ischemic preconditioning ameliorates microcirculatory disturbance through downregulation of TNF-alpha production in a rat cremaster muscle model*. J Biomed Sci, 2004. **11**(6): p. 773-80.
129. Chandrasekharan, U.M., et al., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in tumor necrosis factor-alpha receptor-II (p75)*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(3): p. e16-7.
130. Blessing, E., et al., *Lesion progression and plaque composition are not altered in older apoE-/- mice lacking tumor necrosis factor-alpha receptor p55*. Atherosclerosis, 2004. **176**(2): p. 227-32.
131. Taubitz, A., et al., *Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68167.
132. Hoffmann, U., et al., *Upregulation of TNF receptor type 2 in human and experimental renal allograft rejection*. Am J Transplant, 2009. **9**(4): p. 675-86.
133. Nagano, K., et al., *The tumor necrosis factor type 2 receptor plays a protective role in tumor necrosis factor-alpha-induced bone resorption lacunae on mouse calvariae*. J Bone Miner Metab, 2011. **29**(6): p. 671-81.
134. Sasi, S.P., et al., *Breaking the 'harmony' of TNF-alpha signaling for cancer treatment*. Oncogene, 2012. **31**(37): p. 4117-27.
135. Goukassian, D.A., et al., *Tumor necrosis factor-alpha receptor p75 is required in ischemia-induced neovascularization*. Circulation, 2007. **115**(6): p. 752-62.
136. Yazdanpanah, B., et al., *Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1159-63.
137. Kishore, R., et al., *Tumor necrosis factor-alpha signaling via TNFR1/p55 is deleterious whereas TNFR2/p75 signaling is protective in adult infarct myocardium*. Adv Exp Med Biol, 2011. **691**: p. 433-48.
138. Gao, X., A. Picchi, and C. Zhang, *Upregulation of TNF-alpha and Receptors Contribute to Endothelial Dysfunction in Zucker Diabetic Rats*. Am J Biomed Sci, 2010. **2**(1): p. 1-12.
139. Angel, K., et al., *Effect of 1-year anti-TNF-alpha therapy on aortic stiffness, carotid atherosclerosis, and calprotectin in inflammatory arthropathies: a controlled study*. Am J Hypertens, 2012. **25**(6): p. 644-50.
140. Gonzalez-Juanatey, C., et al., *Anti-TNF-alpha-adalimumab therapy is associated with persistent improvement of endothelial function without progression of carotid intima-media wall thickness in patients with rheumatoid arthritis refractory to conventional therapy*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 674265.
141. Andrisani, G., et al., *Anti-TNF alpha therapy in the management of extraintestinal manifestation of inflammatory bowel disease*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012. **16**(7): p. 890-901.
142. Pech, T., et al., *Perioperative infliximab application has marginal effects on ischemia-reperfusion injury in experimental small bowel transplantation in rats*. Langenbecks Arch Surg, 2012. **397**(1): p. 131-40.
143. Stubgen, J.P., *Tumor necrosis factor-alpha antagonists and neuropathy*. Muscle Nerve, 2008. **37**(3): p. 281-92.

6.5. Eidesstattliche Versicherung

Chaudhry, Daniel Illyas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

*„Die Bedeutung des TNF α - Rezeptors 1 auf die Endothelfunktion nach
Ischämie/Reperfusion“*

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der
Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Rosenheim, 11.02.2016

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand